

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik Abt. Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

## **DISSERTATION**

# **Durchflußzytometrische Untersuchungen zur zellulären Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin**

Von  
Anna-Maria Bartels, geb. Hoffmann  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. J.W.Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Possinger  
2. PD. Dr. med. Späth-Schwalbe  
3. PD. Dr. med. Brockmann

Datum der Promotion: 04. Juli 2002

**Für meine Familie**

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau, Metabolismus, Wirkung und Pharmakologie des Daunorubicins</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Aufbau, Metabolismus, Wirkung und Pharmakologie des Daunorubicins .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Entwicklung, Aufbau und Pharmakologie des liposomal verkapselten Daunorubicins .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Pharmakologische Bedeutung der Apoptose .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methode.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 CCRF-CEM Zellen als in vitro-Modell.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Versuchsreihen.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.1 Durchführung der Invasionsversuche.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2.2 Durchführung der Evasionsversuche .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.3 Durchführung der Apoptoseversuche.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Nachweis morphologischer Veränderungen während der Apoptose mittels Lichtmikroskopie .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Nachweis morphologischer Veränderungen während der Apoptose mittels Lichtmikroskopie .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4.1 Aufbau und Funktionsweise eines Durchflußzytometers .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.2 Probenmessung und Datenauswertung.....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Bestimmung der intrazellulären Verteilung mittels konfokaler Lasermikroskopie.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Ergebnisse der mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Versuche zur Invasionskinetik .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Ergebnisse der mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Versuche zur Evasionskinetik .....</b>	<b>34</b>

---

4.3 Ergebnisse der mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Versuche zur Kinetik der Apoptoseinduktion .....	36
4.4 Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose anhand von Lichtmikroskopie.....	41
4.5 Vergleich der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin und Daunoxome mittels konfokaler Lasermikroskopie.....	46
5. Diskussion .....	52
5.1 Kurze zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit .....	53
5.2 Diskussion der Ergebnisse zur Invasionskinetik .....	56
5.3 Diskussion der Ergebnisse zur Apoptoseinduktion.....	61
5.4 Diskussion der Ergebnisse zur Evasionskinetik .....	63
5.5 Diskussion methodischer Probleme.....	64
5.6 Klinisch-Pharmakologische Bedeutung der vorliegenden Arbeit und Ausblick .....	66
6. Zusammenfassung.....	68
Literaturverzeichnis .....	71
Verzeichnis der Graphiken und Abbildungen.....	79
Verzeichnis der Tabellen .....	81
Danksagung.....	82
Erklärung .....	83
Curriculum Vitae .....	84

## 1. Einleitung

### 1.1 Aufbau, Metabolismus, Wirkung und Pharmakologie des Daunorubicins

In der Bundesrepublik Deutschland erkrankten jährlich 164.900 Männer und 173.400 Frauen neu an Krebs. Seit den 70er Jahren zeigt sich zwar eine Verbesserung der Überlebensraten, trotzdem ergeben sich nur 5–Jahresüberlebensraten von 53% für Frauen und 40% für Männer. Damit steht Krebs als Gruppendiagnose in der Todesursachenstatistik mit ca. 160.000 Todesfällen (23% der Gesamtsterblichkeit) an zweiter Stelle. Diese epidemiologischen Daten machen deutlich, dass Krebserkrankungen einen hohen Stellenwert in der Gesundheitspolitik einnehmen und dadurch auch der Therapie dieser Erkrankungen eine besondere Bedeutung beigemessen wird [1,2]. Lange Zeit allerdings konnten solide Tumoren nur lokal durch Bestrahlung und chirurgische Intervention behandelt werden, während nichtlokalisierte Tumoren wie Leukämien und Metastasen auf diesem Weg nicht oder nur sehr schlecht zu erreichen waren. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts kam es zu einer „therapeutischen Revolution“, da sich tiefgreifende Veränderungen in der Behandlung von Malignomen ergaben. Die Entwicklung von Chemotherapeutika als systemische Therapiemöglichkeit machte große Fortschritte und führte zu besseren Behandlungsergebnissen. Heute wird die Chemotherapie mit Zytostatika als Monotherapie, Polychemotherapie oder in Kombination mit anderen verfügbaren Methoden angewandt [3,4]. Die Wirkung dieser Zytostatika beruht auf der unselektiven Hemmung des Zellwachstums, wobei sowohl Tumorzellen als auch Normalgewebe mit hohem Zellumsatz betroffen sind. Jene unterscheiden sich im wesentlichen durch ungehemmtes Wachstum der Tumorzellen und durch Ausfall der normalen Wachstumsregulation. Eine spezifische Elimination der Tumorzellen ist bisher nicht möglich, obwohl eine große Anzahl verschiedener Zytostatika existiert [5].

Eine bedeutende Rolle in der Behandlung von Tumoren (besonders der akuten Leukämien) spielen die Anthrazykline. Daunorubicin, das erste Anthrazyklin, wurde 1963 entdeckt und gehört auch heute noch zur Standardtherapie in der Onkologie. Da aber die Behandlung mit Daunorubicin u.a. zu schwerer Kardiotoxizität führen kann und vermehrt Resistenzen auftreten, wird stetig an der Weiterentwicklung gearbeitet, um potentere und nebenwirkungsärmere Anthrazykline zu finden. Ein wichtiger Schritt könnte die Verkapselung von Anthrazyklinen in Liposomen darstellen [6,7]. Eines dieser so genannten „liposomalen Anthrazykline“ ist Daunoxome, das aus Daunorubicin in

wässriger Phase umgeben von einer liposomalen Hülle besteht.

Trotz der zunehmenden Anzahl dieser liposomal verkapselten Anthrazykline, die sich im klinischen Gebrauch oder in der Entwicklung befinden, ist vergleichsweise wenig über deren pharmakologische Wirkmechanismen bekannt. Erfolg und Misserfolg der Krebsbehandlung sind aber sowohl von der Sensitivität der Tumorzellen als auch von der Pharmakodynamik der Zytostatika abhängig. Neben der Pharmakodynamik stellt ebenfalls die Pharmakokinetik der Substanzen eine wesentliche Determinante der Wirksamkeit eines Zytostatikums dar, da sie die pharmakologisch relevanten Konzentrationen der Substanzen am Wirkort bestimmt. Deshalb ist es besonders wichtig, diese zu erforschen [8,9].

Aus diesem Grund soll Gegenstand dieser Arbeit der Vergleich der zellulären Pharmakokinetik von Daunorubicin und des liposomal verkapselten Daunoxome sein. Im folgenden wird zunächst kurz auf die Systematik und Pharmakologie der beiden Anthrazykline eingegangen.

## 1.2 Aufbau, Metabolismus, Wirkung und Pharmakologie des Daunorubicins

Daunorubicin wurde 1963 gleichzeitig von einer italienischen Arbeitsgruppe unter der Bezeichnung „daunomycinia“ [10] und von einer französischen Arbeitsgruppe als „rubidomycine“ [11] aus *Streptomyces peucetius*-Kulturen isoliert und erstmals beschrieben. Der heutige Name Daunorubicin ist dann aus beiden Namen zusammengesetzt worden.

Daunorubicin besteht aus einem tetrazyklischen, planaren, polyaromatischen Ringsystem, dem Daunomycinon und einem Aminosucker, dem Daunosamin.

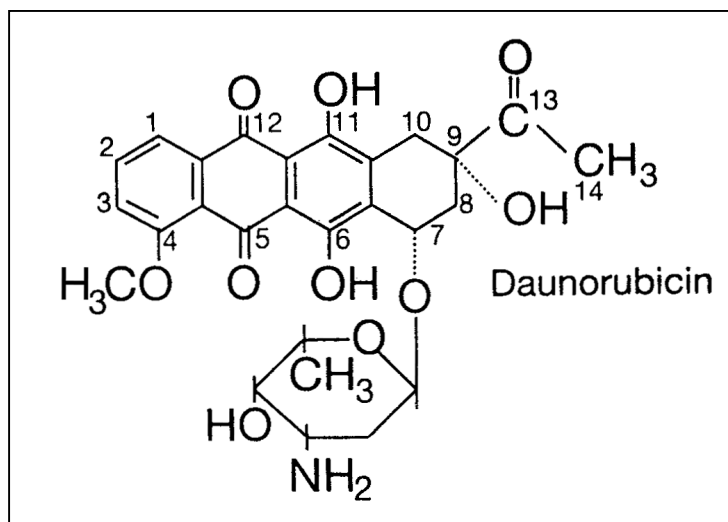


Abb. 1: Strukturformel von Daunorubicin

Der Hauptmetabolit von Daunorubicin ist Daunorubicinol, der durch Reduktion der C-13-Ketogruppe zum entsprechenden C-13-Alkohol entsteht. Daunorubicinol hat ebenfalls Antitumorwirkung und liegt im Plasma in höherer Konzentration als Daunorubicin vor.

Ebenfalls können u.a. 7-Desoxyaglykone und 7-Hydroxyaglykone bei der Metabolisierung entstehen (siehe Abb. 2). Diese Metabolite weisen eine bedeutend geringere zytostatische Aktivität als die Ausgangsverbindungen auf.

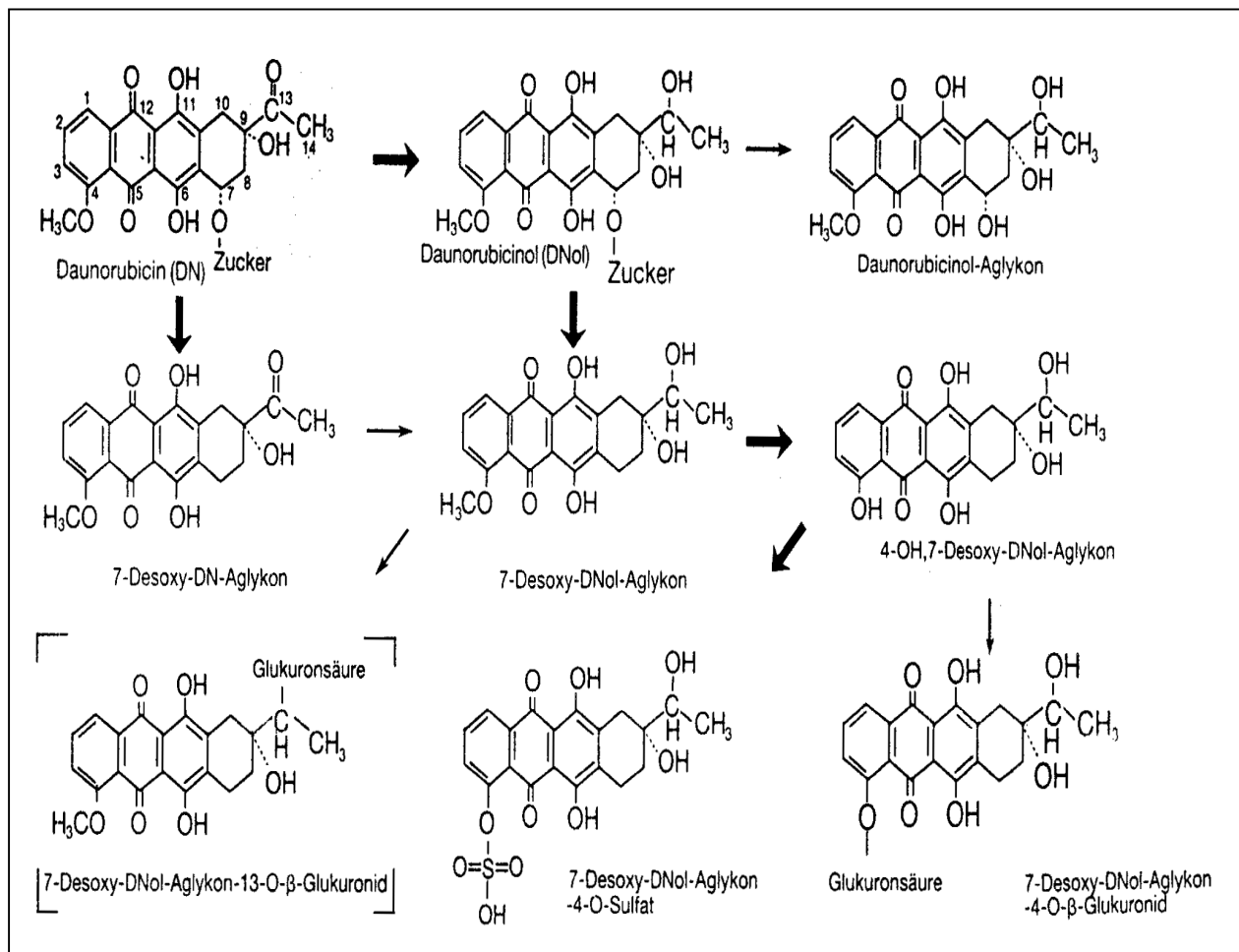


Abb. 2: Darstellung der Metabolisierung von Daunorubicin zu dessen Hauptmetabolit Daunorubicinol und anderen Metaboliten

Daunorubicin ist intensiv orange-rot und absorbiert sowohl im UV-Bereich (bei 254 nm) als auch im sichtbaren Bereich (bei ca. 480 nm) Licht. Es ist daher sehr sensibel gegenüber Licht und sollte deshalb während der Aufbewahrung und der Versuche geschützt werden.

Die polyaromatische Struktur des Daunorubicins bewirkt eine starke Fluoreszenz, weswegen Daunorubicin sehr gut mittels Durchflußzytometrie, konfokaler Lasermikroskopie und auch anderer fluorometrischer Nachweisverfahren erfasst werden kann [12].

Daunorubicin besitzt ein breites Spektrum der Antitumorwirkung, sowohl epitheliale als auch mesenchymale Tumoren sprechen an. Vornehmlich wird Daunorubicin allerdings bei akuter myeloischer und lymphatischer Leukämie angewandt [13,14]. Wechselwirkungen mit anderen Antitumorsubstanzen sind nicht bekannt [15].

Die Wirkung des Anthrazyklins besteht aus einer Vielfalt von Mechanismen und ist in der S- und der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus am ausgeprägtesten. Einige der Wirkmechanismen sind DNA-Interkalation, Hemmung der Topoisomerase I und II, Inhibition der Helicase, Bildung freier Sauerstoffradikale, Veränderung von Membranstruktur- und funktion und letztlich durch Induktion von Apoptose (siehe unter 1.4) [15,16,17].

Die zelluläre Invasion (Einstrom) des nicht-ionisierten Anthrazyklins verläuft durch passive Diffusion. Eine wichtige Rolle für die Invasion spielen der intrazelluläre und der extrazelluläre pH-Wert. Zum Beispiel kommt es bei intrazellulärer Azidose zu gesteigerter intrazellulärer Akkumulation, da die nicht-ionisierte Substanz invadiert, protoniert wird und dadurch unfähig ist, die Zelle wieder zu verlassen. Dementsprechend kommt es bei extrazellulärer Azidose zu einer verminderten Akkumulation. Ebenfalls spielt die Temperatur eine große Rolle für den Einstrom von Daunorubicin in die Zellen, wobei bei 37°C pharmakologische Vorgänge ablaufen, die bei 0°C reduziert oder gehemmt werden [18].

Charakteristisch für die zelluläre Pharmakokinetik der Anthrazykline ist, dass es in kernhaltigen Zellen zu einer starken Akkumulation der Substanzen kommt. Dies erklärt sich durch die Bindung an die Zellmembran, Aufnahme von Daunorubicin in verschiedene intrazelluläre Subkompartimente und die hohe Affinität zur DNA. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass sich Daunorubicin diffus im Zytoplasma verteilt, teilweise mit stärker fluoreszierenden Arealen, die Zellorganellen (morphologisches Substrat der Subkompartimente) entsprechen. Ebenfalls kommt es zu einer starken Fluoreszenz im Zellkern [19].

Der Efflux (Ausstrom) der freien, nicht gebundenen Anthrazykline erfolgt passiv durch Diffusion und zusätzlich aktiv durch ein Membranprotein, dem P-170-Glykoprotein. Die Wirkung dieser Efflux-Pumpe ist ATP-abhängig. Der Verlauf des zellulären Ausstroms ist biphasisch.

Die  $t_{1/2\alpha}$  beträgt bei Daunorubicin 40 min, die terminale Halbwertszeit ( $t_{1/2\beta}$ ) 45-55 h, und es wird rasch aus dem Plasma in die Gewebe aufgenommen. Die Ausscheidung von Daunorubicin erfolgt zu 40-60% langsam über die Galle und in bis zu 15-20% über die Niere [21]. Innerhalb der ersten 24 h p.l. werden etwa 70% der Gesamtmenge ausgeschieden, der Rest in den folgenden Tagen [22,23]. Die Elimination erfolgt zu



36,6% unverändert, zu 30% als Daunorubicinol und zu 33,3% in Form anderer Metabolite [24].

Da Daunorubicin sowohl von Tumorzellen als auch von Normalgewebe mit hohem Zellumsatz aufgenommen wird, kommt es neben der gewünschten Antitumor-Wirkung auch zu unerwünschten Nebenwirkungen. Knochenmarksuppression mit Thrombo-, Lympho- und Erythrozytopenie und Mukositis stellen häufige akute Toxizitäten dar. Ebenfalls treten gastrointestinale Nebenwirkungen mit Übelkeit und Appetitsverlust, Alopezie, Nephrotoxizität und weitere Nebenwirkungen auf [25]. Ein besonderes Problem ist die Kardiotoxizität, die in eine akute („Soforttyp“) und eine chronische („Spättyp“) Manifestationsform untergliedert wird und welche die verzögert auftretende (kumulative) dosislimitierende Toxizität darstellt. Im fortgeschrittenen Stadium kann sich daraus eine diffuse Myokardfibrose entwickeln. Dies kann zum Herzversagen führen und endet häufig tödlich [26,27,28].

Ein weiteres großes Problem stellt die Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber Anthrazyklinen dar. Bei einem Großteil der resistenten Zelllinien kommt es zur Überexpression des P-170-Glykoproteins („Multidrug resistance“). Dies führt zu einem erhöhten Daunorubicin-efflux und einer verminderten Akkumulation in der Zelle, was zu einem Wirksamkeitsverlust führt. Außer dem „Multidrug resistance“ Phänotyp (MDR) sind noch andere Resistenzmechanismen identifiziert worden, z.B. „multidrug resistance-associated protein“ (MRP), veränderte DNA-Topoisomerase-II-Aktivität und Veränderungen im Gluthation-Stoffwechsel [16,17,29].

Aufgrund dieser zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber den häufig klinisch verwendeten Anthrazyklinen und deren dosislimitierender Kardiotoxizität wird stetig an der Weiterentwicklung neuer Substanzen gearbeitet. Diese sollten potenter und nebenwirkungsärmer sein und ebenfalls eine verbesserte Antitumorwirkung und Pharmakokinetik aufweisen [30,31]. Eines dieser weiterentwickelten Anthrazykline könnte das liposomal verkapselte Daunorubicin, genannt Daunoxome darstellen.

### 1.3 Entwicklung, Aufbau und Pharmakologie des liposomal verkapselten Daunorubicins

Liposome sind geschlossene, runde Vesikel, die durch eine Reihe amphipathischer Substanzen, z.B. Phospholipide, gebildet werden. Bei Kontakt mit wässrigen Lösungen ordnen sich die Substanzen in Membrandoppelschichten an. Hierbei können verschiedene Substanzen in die Liposome eingeschlossen werden.

Die erste Beschreibung von Liposomen verfassten 1965 Bangham et al. [32], den Namen „Liposome“ erhielten sie dann 1968 von Sessa und Weissmann [33]. Es kam zu einer stetigen Weiterentwicklung, besonders im Bereich der Stabilität im Plasma. Die erste Generation von Liposomen war gekennzeichnet durch eine niedrige Zirkulationszeit im Serum und eine hohe Aufnahme durch das retikulo-endotheliale System (RES). Mitte der 80er Jahre kam es dann zur Entwicklung der zweiten Generation, bei denen die Affinität zum RES deutlich verringert war. Dies gelang durch die Konstruktion stabiler Liposome, bei denen auf der Liposomoberfläche Polyethylenglykol kovalent an Phospholipide gebunden war und durch die Kombination mit Cholesterin. Dadurch wurde die Oberfläche hydrophil, die Bindung an Plasmaproteine und die Aufnahme durch das RES nahm ab, und die Zirkulationszeit nahm zu [34,35,36,37].

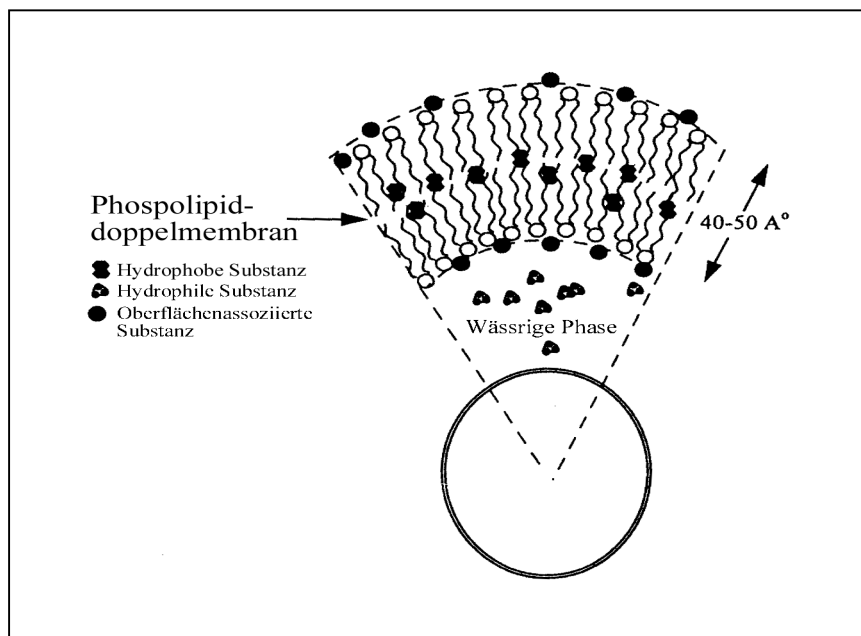


Abb. 3: Darstellung der Lipiddoppelschicht und des wässrigen Kerns eines Liposom und des Einbaus von hydrophilen und lipophilen Substanzen [aus Sharma, [38]]

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Liposomen, z.B. Größe, Membranfluidität und Oberflächenladung, hängen von der Lipidzusammensetzung und der Herstellungsmethode ab. Hydrophile Substanzen werden im inneren wässrigen Kern eingeschlossen, lipophile (hydrophobe) und amphiphile Stoffe werden in die Phospholipidschicht integriert (siehe Abb. 3) [39].

Eines dieser Substanzen ist das Daunoxome. Es sind kleine (60-80 nm), unilamelläre, negativ geladene Liposome. Im inneren wässrigen Kern befindet sich das Citratsalz von Daunorubicin, welches von einer einzigen doppelschichtigen Membran umgeben wird. Diese besteht aus Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) und Cholesterin im molekularen Verhältnis 2:1 (siehe Abb. 4) [40].

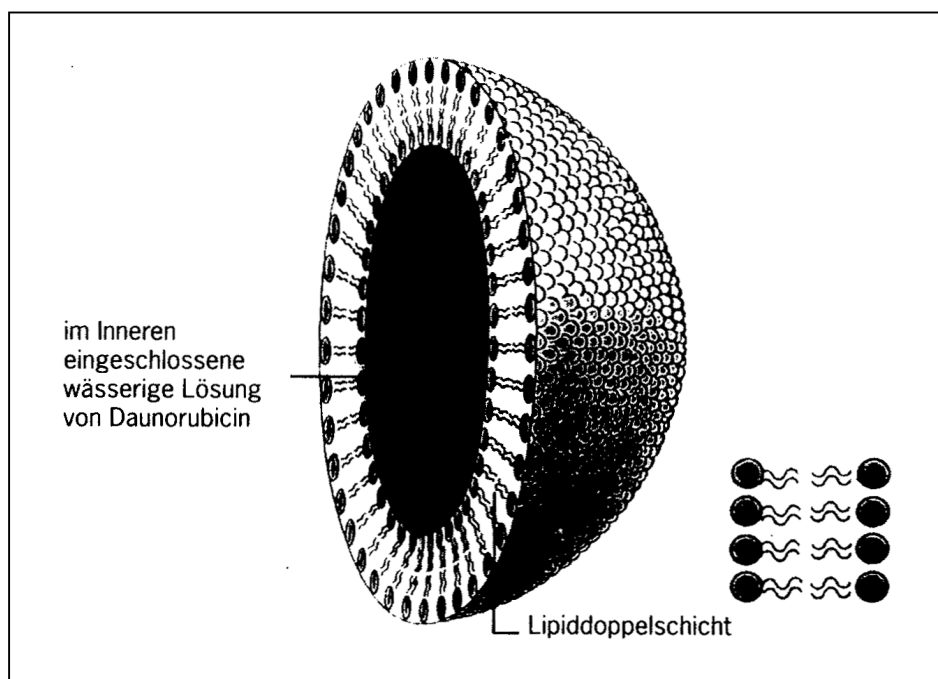


Abb. 4: Struktur des Daunoxome [aus NeXstar [41]]

Diese besondere Zusammensetzung verleiht Daunoxome eine große physikalische Stabilität. Die Zugabe von Cholesterin verstärkt die Lipiddoppelschicht und dadurch die Resistenz gegenüber dem Austritt des eingeschlossenen Daunorubicins. Ebenfalls führt es zu einer gesteigerten liposomalen Stabilität im Serum, da es den Verlust von Phospholipiden an Lipoproteine kontrolliert.

Anwendung in der klinischen Behandlung von Tumoren findet Daunoxome meistens im Rahmen von klinischen Studien z.B. beim HIV-assoziiertem Kaposi-Sarkom und bei hämatologischen Erkrankungen.

Es wird angenommen, dass die Wirkmechanismen denen des freien Daunorubicins entsprechen, wobei noch nicht ausreichend geklärt ist, ob die Liposomen selbst eine

Antitumoraktivität besitzen [42]. Einige Autoren postulieren, dass im Vergleich zum freien Daunorubicin das verkapselte Daunorubicin eine höhere Zytotoxizität (zwei-dreifach erhöht) aufweist und eine größere Menge der Substanz den Tumor erreicht [19,42,43,44,45].

Die zellulär pharmakokinetischen Daten von Daunoxome unterscheiden sich wesentlich gegenüber denen von freiem Daunorubicin. Die Invasion des intakten Daunoxome erfolgt über Endozytose. Da eine fortwährende Freisetzung des Daunorubicins aus den Liposomen zu erfolgen scheint, akkumuliert Daunoxome deutlich langsamer und länger anhaltend in die Zellen und erreicht so höhere Tumorspitzenkonzentrationen [19]. Die Halbwertszeit ist gegenüber freiem Daunorubicin ebenfalls erhöht,  $t_{1/2\alpha}$  beträgt 2,8-5,2 h [45]. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass sich Daunoxome eher lokalisiert und weniger diffus im Zytoplasma verteilt mit einer anfangs geringeren Kernfluoreszenz. Diese nimmt aber nach längerer Inkubationszeit stark zu und übertrifft die des Zytoplasmas.

Die Daten zur Plasmapharmakokinetik beschreiben für das verkapselte Daunorubicins im Gegensatz zu freiem Daunorubicin eine monophasische Elimination [45,46,47].

Die Metabolisierungsschritte des liposomal verkapselten Daunorubicins ähneln denen des freien Daunorubicins (siehe Abb. 2). Der Hauptmetabolit des Daunoxome ist nach Freisetzung des Daunorubicins ebenfalls Daunorubicinol. Allerdings wird eine starke Abnahme der Reduktion der C-13-Ketogruppe zum entsprechenden C-13-Alkohol beobachtet. Deshalb liegt die Konzentration von Daunorubicinol bei Patienten, die mit Daunoxome behandelt werden, deutlich niedriger als nach Behandlung mit freiem Daunorubicin [46].

Das Toxizitätsprofil von Daunoxome scheint im Gegensatz zu freiem Daunorubicin beträchtlich reduziert zu sein. Am häufigsten treten hämatologische Toxizitäten auf, neben Neutropenie ebenfalls Thrombozytopenie und Anämie. Andere Nebenwirkungen erscheinen selten und mild, wie z.B. Alopezie, Übelkeit und Mukositis. In einigen Studien wird von Patienten berichtet, die neben hämatologischen Toxizitäten keine weiteren aufweisen [43,45,48]. Auch die kardiale Beteiligung ist bei Behandlung mit verkapseltem Daunorubicin deutlich seltener und geringer ausgeprägt gegenüber Behandlungen mit anderen Anthrazyklinen. In echokardiographischen Befunden konnten bei einigen Patienten vor und nach Therapie mit liposomal verkapseltem Daunorubicin keine Unterschiede in der Myokardfunktion ausgemacht werden [43, 49,50].

Die Entwicklung der liposomalen Verkapselung von Daunorubicin könnte einen großen Fortschritt in der Behandlung von resistenten Zellen im Vergleich zur Behandlung mit freiem Daunorubicin darstellen. Daunoxome scheint P-170-Glykoprotein-assoziierte Resistenzen überwinden zu können, vermehrt in resistenten Zellen zu akkumulieren und

dadurch zytotoxisch agieren zu können [34,42,50,51]. Bisher liegen allerdings nur sehr wenig Daten über die zelluläre Pharmakokinetik von Daunoxome im Vergleich zu Daunorubicin vor, welche die Grundlage für weitere Forschungen zu Toxizität und Resistenzen darstellen könnten.

#### **1.4 Pharmakologische Bedeutung der Apoptose**

Apoptose ist eine aktive, physiologische Art des Zelltods. Sie wird auch programmierter Zelltod genannt, da es sich um einen „suizidalen Prozess“ handelt, bei dem die Zelle selbst ein genetisch determiniertes Programm aktiviert, welches zum Zelltod führt. Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Homeostase der Gewebe, indem ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten wird [52,53].

Bei der Apoptose handelt es sich um einen vielseitigen Mechanismus, in den viele Regulatoren und Trigger involviert sind und der durch typische biochemische und morphologische Veränderungen gekennzeichnet ist. Viele dieser Prozesse sind allerdings noch unbekannt.

Als Trigger für das Apoptoseprogramm gelten Entzug der Wachstumsfaktoren, der Tumor–Nekrose–Faktor, DNA–Schäden, Fas–Ligandenbindung, Glukokortikoide und Behandlung mit UV-Strahlen oder Chemotherapeutika [54]. Hier entsteht Apoptose häufig als finaler Prozess der Zytotoxizität, besonders bei Substanzen, die stabile Komplexe mit der DNA bilden, wie z.B. Anthrazykline [55]. Wie unter 1.2 bereits erwähnt, spielt auch bei Daunorubicin die Apoptoseinduktion als Wirkmechanismus eine Rolle. Da es eine lipophile Substanz ist, verteilt sich Daunorubicin relativ schnell in den Zellen und diffundiert in den Kern. Dort interkaliert es in die DNA und inhibiert gleichzeitig die Topoisomerase II, nachdem dieses Enzym Doppelstrangbrüche verursacht und zu DNA–Schäden geführt hat. Diese Vorgänge scheinen als Trigger für die Apoptoseinduktion von Daunorubicin verantwortlich zu sein [56,57,58,59].

Es gibt allerdings keine Beweise, dass der durch Anthrazykline induzierte Zelltod ausschließlich durch Apoptose hervorgerufen wird [12].

Die Trigger initiieren eine Kaskade von Ereignissen, die mit Apoptose (Zelltod) enden. Die Dauer zwischen Exposition mit dem Trigger und Erscheinen der ersten Zeichen morphologischer Veränderungen („Triggerphase“) von Apoptose variiert stark. Sie ist u.a. abhängig vom Zelltyp, Triggerart und Wachstumsverhältnissen der Zellen. Alle unterschiedlichen Induktionssysteme scheinen aber eine proteolytische Kaskade zu aktivieren, in die das „Interleukin Converting Enzym“ (ICE) und ICE–ähnliche Proteaseformen (Caspase–Familie) involviert sind.

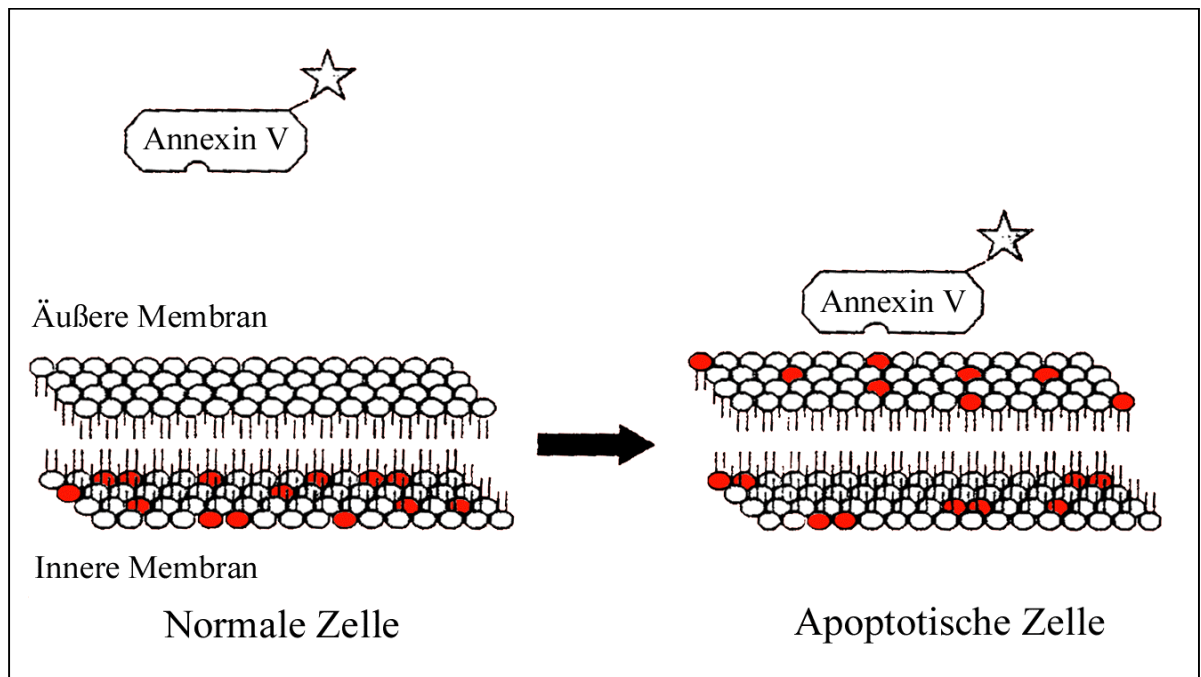
Es sind ebenfalls einige Gene benannt worden, die im Zusammenhang mit der initialen Phase von Apoptose stehen. Dazu zählt das bcl2-Gen, welches Zellen gegen Apoptose protektiert. Dies geschieht durch Entgegenwirken der Effekte der bax-Genfamilie, die apoptoseinduzierend wirken [60,61,62].

Die Aktivierung der proteolytischen Kaskade scheint der Anfang der „Exekutionsphase“ (Spätphase) im apoptotischen Prozess zu sein. Diese ist relativ kurz und weist nur eine geringe Variation der Dauer auf. Durch die Aktivierung der Caspase-Familie kommt es zur Zerstörung von zellulären Proteinen, was nach und nach zur totalen Desintegration und letztendlich zur Phagozytose der apoptotischen Zellen führt.

Zu diesem Zeitpunkt kommt es auch zu Veränderungen der Plasmamembran. Vitale Zellen halten eine asymmetrische Verteilung von verschiedenen Phospholipiden zwischen der äußeren und inneren Membran der Lipiddoppelmembran aufrecht. Phosphatidylserine (PS) erscheinen nur auf der inneren Membran zum Zytoplasma zeigend. Während der Apoptose kommt es zu einem Verlust dieser Asymmetrie und zum Auftreten von Phosphatidylserinen auf der äußeren Membran (siehe Abb. 5). Dies führt zur spezifischen Erkennung der apoptotischen Zellen durch Makrophagen und zur Phagozytose. Das Auftreten von PS auf der äußeren Seite der Zellmembran scheint von der frühen „Exekutionsphase“ der Apoptose bis zum Ende zu dauern [52].

Durch das Auftreten von Phosphatidylserinen auf der äußeren Membran der Lipiddoppelschicht ist es möglich, apoptotische Zellen zu markieren und von vitalen und nekrotischen Zellen getrennt darzustellen. Annexin V besitzt eine hohe Affinität zu diesen exponierten Phosphatidylserine und bindet deshalb dieses in Gegenwart von Kalzium an apoptotische Zellen. Durch Fluoreszenzmarkierung des Annexins wird es so möglich, apoptotische Zellen mittels Durchflußzytometrie zu erfassen und von vitalen Zellen abzugrenzen (siehe Abb. 10).

Durch Doppelmarkierung mit Propidium Iodid (PI) ist zusätzlich die Abgrenzung von apoptotischen zu nekrotischen Zellen möglich, da apoptotische Zellen Annexin V binden und PI ausschließen. Nekrotische Zellen nehmen auch PI auf und werden dadurch PI positiv.



*Abb. 5: Schematische Darstellung der äußeren und inneren Membran von vitalen und apoptotischen Zellen und dem Verlust der Asymmetrie der Lipiddoppelschicht während der Apoptose und der Exposition von Phosphatidylserinen (PS, rote Kreise) auf der äußeren Membran [aus van Engeland, [52]]*

Während viele molekulare Vorgänge der Apoptose noch unbekannt sind, gelten bestimmte morphologische Veränderungen als relativ spezifisch für die Apoptose. Ein frühes Ereignis stellt die Zelldehydratation dar. Der Verlust von intrazellulärem Wasser führt zur Kondensation des Zytoplasmas, gefolgt von Veränderungen in der Zellgröße und dem Zellaussehen. Die physiologisch runden Zellen werden ovaler und kleiner.

Charakteristisch ist auch die Kondensation des nuklearen Chromatins. Dies nimmt häufig eine konkave Form an (halbmond-, hufeisen- oder sichelförmig). Die DNA im kondensierten Chromatin wird zuerst hyperchromatisch (Kernpyknose) und lässt sich stark anfärben. Daraufhin kommt es zu Desintegration der Kernstruktur durch proteolytischen Abbau, und es folgen die nukleare Fragmentation (Karyorrhexis) und die Kernauflösung (Karyolysis). Einzelne Kernfragmente verteilen sich im Zytoplasma und werden zusammen mit intakten Organellen in Teile der Plasmamembran verpackt. Diese werden „apoptotische Körper“ genannt (siehe Abb. 6) und trennen sich von der sterbenden Zelle. Später werden sie dann phagozytiert [63,64].

Die strukturelle Integrität der Plasmamembran und auch der größte Teil ihrer Funktion bleibt während der initialen Phase der Apoptose erhalten. Auch die Zellorganellen verändern sich während der Apoptose zunächst nicht, auch wenn das mitochondriale transmembrane Potential deutlich abnimmt [65,66,67].

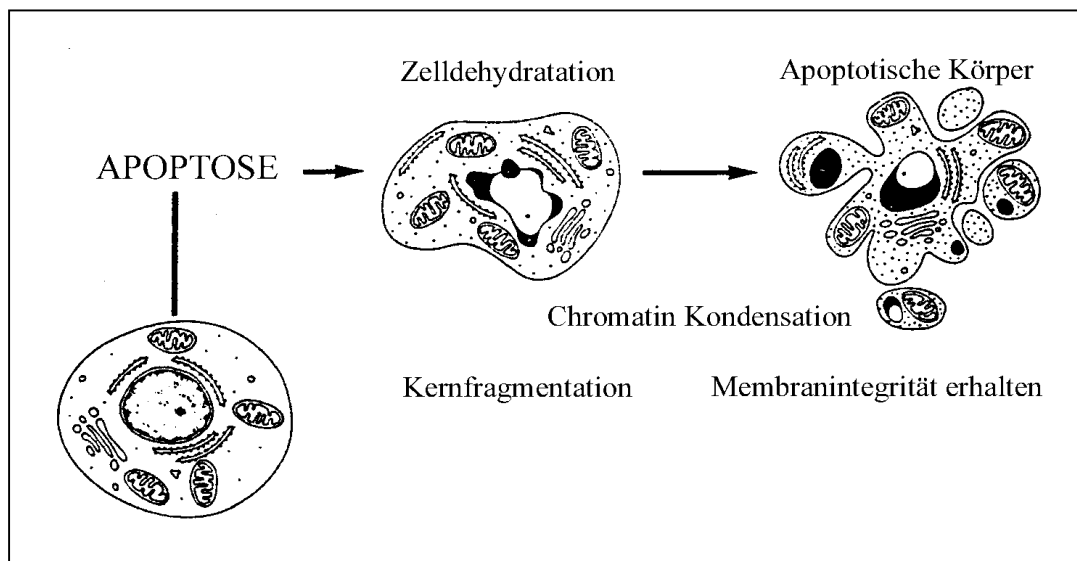


Abb. 6: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose mit Zelldehydratation (Abnahme der Zellgröße), Chromatinkondensation, Kernfragmentation und Bildung von apoptotischen Körpern mit Erhalt der Plasmamembranintegrität [aus Darzynkiewicz, [60]]

Da Apoptose durch eine Vielzahl von Triggern induziert werden kann und durch ein großes Netzwerk regulatorischer Prozesse gesteuert wird, ergibt sich die Frage, ob durch Eingreifen in diesen Ablauf die Sensitivität von Tumor- und Normalzellen gegenüber Antitumorsubstanzen veränderbar ist, um die Effizienz zu erhöhen und die Toxizität zu senken.

Es ist ebenfalls deutlich geworden, dass Tumorprogression und Zunahme der Malignität mit Veränderungen der Fähigkeit assoziiert sein können, spontan Apoptose zu durchlaufen [60,68]. Aus diesen Gründen ist es von Interesse, die Apoptoserate bei Behandlung mit Antitumorsubstanzen zu messen und miteinander zu vergleichen. Trotz stetig zunehmender Zahl von Untersuchungen über Apoptosevorgänge liegen bislang sehr wenig Daten über die Apoptoseinduktion durch liposomal verkapseltes Daunorubicin und über den direkten Vergleich der Apoptoseinduktion durch freies und verkapseltes Daunorubicin vor. Ebenfalls ist die Geschwindigkeit der

Apoptoseinduktion als Parameter der Pharmakodynamik (besonders der Wirksamkeit) bisher nicht in Untersuchungen über den direkten Vergleich der zellulären Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin miteinbezogen worden. Von daher wird dies und die

allgemeinen Untersuchungen zur zellulären Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin in dieser Arbeit zum Gegenstand gemacht.



---

Für diese Untersuchungen werden CEM-Leukämiezellen verwendet, da sie sich besonders gut für Messungen zur Kinetik und zu Apoptosevorgänge eignen, da sie allgemein zu Apoptoseinduktion neigen.

Für die meisten Untersuchungen wird in dieser Arbeit die Durchflußzytometrie als Methode gewählt. Sie liefert schnell quantitative, objektive und vergleichbare Daten. Diese sollten allerdings durch lichtmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden, da die morphologischen Veränderungen während der Apoptose einzigartig sind und die Abgrenzung zu vitalen Zellen möglich machen [60,65,69].

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung der beiden Substanzen werden mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt und dokumentiert.

## 2. Aufgabenstellung

Aus dem vorher gesagten ergibt sich, dass Anthrazykline verschiedene Wirkmechanismen aufweisen, wie DNA-Interkalation, Topoisomerase II-Hemmung und auch die Apoptoseinduktion. Entscheidend für die Wirksamkeit ist jedoch die Konzentration der Substanzen am Wirkort (zelluläre Pharmakokinetik) und die Wirksamkeit z.B. Zelltod in Abhängigkeit von der zellulären Konzentration (zelluläre Pharmakodynamik).

Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, die Konzentrationen von Daunorubicin zu untersuchen, die am Wirkort nach Exposition mit freiem oder liposomal verkapseltem Daunorubicin erreicht werden. Als Parameter dieser am Tumor erreichten Konzentrationen wird in der vorliegenden Arbeit die intrazelluläre Konzentration der Substanzen in den Zellen bestimmt. Diese Konzentrationen werden durch den Influx und auch den Efflux determiniert. Im folgenden Modell sollen diese Invasions- und Evasionsvorgänge getrennt untersucht werden. Zusätzlich soll die intrazelluläre Verteilung der beiden Substanzen ermittelt werden.

Neben Invasion und Evasion soll auch die Rate der Apoptoseinduktion gemessen werden. Sie stellt einen Hinweis auf die wirksame Konzentration am Wirkort dar und eignet sich deshalb hervorragend als Parameter, um Pharmakodynamik und Pharmakokinetik miteinander zu verbinden.

Für alle Untersuchungen werden die Fluoreszenzintensitäten in den Zellen mittels Durchflußzytometrie und konfokaler Lasermikroskopie gemessen. Diese entsprechen den intrazellulären Konzentrationen von freiem oder liposomal verkapseltem Daunorubicin.

Konkret sollen folgende Fragen untersucht werden:

Zur Invasion und intrazellulären Verteilung:

1. Gibt es Unterschiede in der maximal erreichten Konzentration und der Einstromgeschwindigkeit von Daunorubicin und Daunoxome?
2. Liefert die Einstromkinetik Hinweise auf die physiochemischen Aufnahmemechanismen?
3. Bestehen Zusammenhänge zwischen der eingesetzten, extrazellulären und der gemessenen, intrazellulären Konzentration der Substanzen?
4. Gibt es Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin?

---

Zur Evasion:

1. Bestehen Unterschiede im Verlauf und in der Dauer der Evasion der beiden Substanzen?
2. Liefert die Ausstromkinetik Hinweise über Vorgänge der Kompartimentverteilung (qualitativ)?

Zur Apoptose:

1. Gibt es Unterschiede in der Apoptoseinduktion und deren Verlauf durch freies und liposomal verkapseltes Daunorubicin (Pharmakodynamische Daten)?
2. Bestehen Zusammenhänge zwischen der eingesetzten, extrazellulären Konzentration der Substanzen und der Apoptoseinduktion?
3. Liefert der Verlauf der Apoptoseinduktion durch die beiden Substanzen Hinweise auf die Pharmakokinetik am Wirkort?

### 3. Material und Methode

#### 3.1 CCRF-CEM Zellen als in vitro-Modell

CCRF-CEM ist eine humane T-lymphatische Zelllinie, die 1964 aus peripherem Blut eines 4-jährigen Mädchens mit akuter lymphatischer Leukämie von G. E. Foley et al. [70] gewonnen wurde (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland ).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen werden in einer Suspension kultiviert und wachsen in einem Medium bestehend aus 90% RPMI Medium und 10% inaktiviertem fetalem Kälberserum (Seromed Biochrom KG, Berlin). Als Behältnisse werden FALCON Gewebekulturflaschen (200 ml) verwendet (Nunc Brand Products, Denmark).

Die zunächst tiefgefrorenen CEM-Zellen (Stickstoff, -125°C, konserviert in 95% RPMI und 5% DMSO) werden nach dem Auftauen in 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Sigma Chemie) resuspendiert und anschliessend über 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert (Hettich

Universal 30RF Zentrifuge) und dann mit Wachstumsmedium aufgefüllt.

Der anschließende Trypanblautest zeigt den prozentualen Anteil vitaler Zellen auf. Dafür wird 10 µl Zellsuspension zu 90 µl einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung (Sigma Chemie) pipettiert und in die Zählkammer gegeben. Der Anteil gefärbter Zellen wird bestimmt, welcher als avital anzusehen ist. Die Formel hierfür lautet:

$$\text{Zellzahl} \times 10^6/\text{ml} = \frac{\text{Zellzahl in 4 Eckquadrate}}{40}$$

Die Gesamtzellzahl wird analog mit 90 µl 10%iger Essigsäure bestimmt.

Danach erfolgt die Aussaat der Zellen in die Gewebekulturflaschen mit Zugabe von 20 ml Wachstumsmedium (siehe oben). Die Zellzahl soll  $2-3 \times 10^6$  betragen. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank (Cytoperm Heraeus, Berlin) bei +37°C und 5% CO<sub>2</sub>, und alle 2-3 Tage wird die Zellsuspension geteilt („splitten“) und mit frischem Medium aufgefüllt. So lässt sich zuverlässig ein exponentielles Wachstum der Zellen erzielen. Vor den Messungen werden die Proben bei

---

0-4°C aufbewahrt, um weitere Diffusionsvorgänge zu reduzieren [18].

Die Versuche sind alle 24 Stunden nach dem so genannten Splitten durchzuführen, da sich die Zellen in der Wachstumsphase befinden. Der Zellzyklus wird nicht synchronisiert, da gezeigt wurde, dass dies nur einen geringen Effekt auf den Ein- und Ausstrom von Anthrazyklinen hat [71]. Diese konstanten Vorraussetzungen werden bei allen Versuchen eingehalten.

## **3.2 Versuchsreihen**

### **3.2.1 Durchführung der Invasionsversuche**

Um Unterschiede in der zellulären Pharmakokinetik von Daunorubicin (Daunoblastin, Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen) und Daunoxome (Nexstar Pharmaceuticals, Martinsried) erfassen zu können, sind verschiedene Versuche erforderlich. Die ersten Versuche konzentrieren sich auf die Invasion der beiden Chemotherapeutika bei verschiedenen extrazellulären Konzentrationen. Es werden die Fluoreszenzintensitäten der CEM-Zellen nach Gabe von Daunorubicin oder Daunoxome bei zunehmenden Inkubationszeiten gemessen.

Hierfür werden sieben Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Zellsuspension aufgefüllt, zu denen dann Daunorubicin oder Daunoxome pipettiert werden (nach Vorverdünnungen der Stammlösung von 2 mg/ml Daunorubicin oder Daunoxome). Es werden Endkonzentrationen von 1, 5 und 10 µg/ml erreicht. Eine Kulturflasche mit Zellsuspension bleibt ohne Zusatz als Kontrolle.

Für die Untersuchungen werden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120, 180, 360, 540 und einmalig 720 Minuten nach Zusatz von Daunorubicin bzw. Daunoxome Aliquote aus den Kulturflaschen entnommen, aufgearbeitet und mittels Durchflußzytometrie (siehe unten) bestimmt.

Der Ablauf im einzelnen ist folgender:

1. Abnahme von je 500 µl Zellsuspension von allen sieben Kulturflaschen und Gabe in Reagenzröhrchen und Zusatz von 2 ml auf 4°C gekühltem PBS
2. Fünf Minuten Zentrifugation mit 1000 U/min bei 4°C
3. Überstand dekantieren und Zellpellet mit 2 ml 4°C gekühltem PBS resuspendieren
4. Erneut fünf Minuten zentrifugieren mit 1000 U/min bei 4°C
5. Resuspension des Zellpellets mit 500 µl PBS nach Dekantieren
6. Messungen mittels Durchflußzytometer (siehe unten)

Die Kulturflaschen befinden sich zwischen den Abnahmen im Inkubator. Die Arbeitsschritte finden unter sterilen Bedingungen in der Laminarflowbox (Integra Biosciences) statt.

Anhand der Fluoreszenz gegen die Zeit-Kurve können zusätzlich die Anfangsgeschwindigkeit ( $V_{30}$ ) und die maximale Geschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) für jeden Invasionsversuch berechnet werden. Hierzu gelten die Formeln:

$$V_{\max} = dF/dT$$

$$V_{30} = F_{30\min} - F_{0\min} / 30 \text{ min}$$

$V_{\max}$  = Tangente der maximalen Steigung (maximale Änderung der Fluoreszenz)

$V_{30}$  = Tangente der Anfangssteigerung (Anfangsgeschwindigkeit)

dF = Fluoreszenzdifferenz

dt = Zeitdifferenz

### 3.2.2 Durchführung der Evasionsversuche

Als zweite Versuchsreihe werden die Evasionsversuche durchgeführt. In diesen Versuchen soll der Ausstrom des Medikaments nach zweistündiger Inkubation der Zellsuspensionen nach Gabe von Daunorubicin oder Daunoxome bei unterschiedlichen extrazellulären Konzentrationen ermittelt werden.

Es werden ebenfalls sieben Kulturflaschen mit 10 ml Zellsuspension gefüllt. Dazu werden entweder Daunorubicin oder Daunoxome gegeben und Endkonzentrationen von 1 µg/ml, 5 µg/ml oder 10 µg/ml erreicht. Eine Flasche bleibt ohne Zusatz als Kontrolle. Danach werden alle für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die weiteren Arbeitsschritte sind folgende:

1. Zentrifugation der gesamten Zellsuspensionen bei 4°C und 1000 U/min für fünf Minuten
2. Dekantieren und Auffüllen des Zellpellets mit 2 ml 4°C gekühltem PBS
3. Wiederholung des 1. Arbeitsschrittes
4. Dekantieren und mit 10 ml frischem RPMI-Medium resuspendieren
5. Präparation vor den Messungen siehe Invasionsversuche Arbeitsschritte 1-5
6. Durchflußzytometrische Analyse

Die Messungen erfolgen 0, 60, 120, 180 und 300 Minuten nach Inkubation, da nach 2 h ausreichend hohe Konzentrationen der Substanzen in den Zellen vorliegen, aber keine

irreversiblen Bindungen eingegangen sind und somit Rückverteilungsvorgänge noch stattfinden können.

Die Arbeitsschritte finden ebenfalls unter sterilen Bedingungen in der Laminarflowbox statt.

### **3.2.3 Durchführung der Apoptoseversuche**

Die Apoptoseversuche werden mit Zweifachfärbung durch Annexin V (Bender Med Systems Diagnostics GmbH, Wien) und PI (Propidium Iodid, Sigma Chemie) durchgeführt. Da apoptotische Zellen die Asymmetrie ihrer Phospholipiddoppelmembran verlieren und dabei Phosphatidylserine (PS) auf der äußeren Seite der Membran exponieren, bindet Annexin V wegen seiner hohen Affinität zu PS an die apoptotischen Zellen. Dadurch kann quantitativ der Prozentsatz der Zellen, die apoptotisch werden, bestimmt werden. Durch Fluoreszenzmarkierung des Annexins kann dies mittels Durchflußzytometrie dargestellt werden.

Es werden 11 Kulturflaschen mit je 10 ml Zellsuspension gefüllt und Daunorubicin oder Daunoxome dazu pipettiert, um Endkonzentrationen von 1, 5 oder 10 µg/ml zu erreichen. Eine Kulturflasche ohne Zusatz gilt als Kontrolle. Die Versuchsreihe wird als Doppelversuch durchgeführt.

Die Messungen werden nach 120, 240, 360 und 480 min Inkubation durchgeführt, zwischenzeitlich befinden sich die Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die Arbeitsschritte sind folgende:

1. Abnahme von 400 µl Zellsuspension und Umfüllen in ein Eppendorfgefäß
2. Zweimaliges Waschen mit PBS und Zentrifugieren (siehe Arbeitsschritte bei 3.2.1)
3. Resuspension mit 1X Binding Buffer (dieser wird hergestellt aus 1 ml 10X Konzentrat und 9 ml sterilem destilliertem Wasser) zu einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml
4. Transfer von 100 µl der Zellsuspension in ein anderes Gefäß
5. Zugabe von 10 µl Fluoreszin-konjugiertem Annexin V und 10 µl PI Reagenz
6. Mit Vortex mixen und Inkubation für 15 min bei 20-25°C in Dunkelheit
7. Danach Zugabe von 400 µl 1X Binding Buffer und durchflußzytometrische Analyse

Alle Arbeitsschritte laufen unter sterilen Bedingungen ab.

### **3.3 Nachweis morphologischer Veränderungen während der Apoptose mittels Lichtmikroskopie**

Zur besseren Unterscheidung von nekrotischen, apoptotischen und vitalen Zellen ist es sinnvoll, neben durchflußzytometrischen Messungen lichtmikroskopische Untersuchungen durchzuführen (Leitz Labor Lux S Mikroskop). Dies gilt als Bestätigung, dass die mittels Durchflußzytometrie als apoptotisch erfassten Zellen wirklich apoptotisch sind und die typischen morphologischen Veränderungen aufweisen. Zur Dokumentation werden diese apoptotischen Veränderungen photographisch festgehalten.

Der Ablauf ist folgender:

1. 500 µl Zellsuspension abnehmen und in die Zytozentrifuge geben
2. Bei 1000 U/min 5 min zentrifugieren
3. Objektträger mit May-Grünwald/Giemsa-Lösung (Merck-Darmstadt) färben
4. Mikroskopieren und mittels Kamera (Leitz mit Bildautomatik) Bilder festhalten

Diese Arbeitsschritte werden parallel zu allen Apoptoseversuchen (wie unter 3.2 beschrieben) von Daunorubicin und Daunoxome zu allen Zeitpunkten durchgeführt.

### **3.4 Nachweis morphologischer Veränderungen während der Apoptose mittels Lichtmikroskopie**

Das Durchflußzytometer gilt als schnelle und elegante Methode, um eine hohe Anzahl von Zellen in einer geringen Zeit zu messen und quantitativ zu erfassen [65].

Da sich Daunorubicin bei 488 nm zu einer intensiven Fluoreszenz im Rotbereich anregen lässt, ist es möglich, die intrazelluläre Konzentration der Substanzen über die Fluoreszenzintensitäten mittels Durchflußzytometer zu bestimmen. CEM-Zellen besitzen eine sehr niedrige Autofluoreszenz, deshalb lässt sich die Anthrazyklin-bedingte Fluoreszenz bei ihnen gut abgrenzen [72]. Dies macht funktionelle Messungen zur zellulären Pharmakokinetik mit Ein- und Ausstrom und der Apoptoseinduktion durch Anthrazykline mittels Durchflußzytometrie möglich [73].



### 3.4.1 Aufbau und Funktionsweise eines Durchflußzytometers

Das Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers besteht darin, dass nach „hydrodynamischer Fokussierung“ die Zellen einzeln wie Perlen an einer Perlenkette die Messkammer an einer definierten Stelle passieren. Dort werden sie von einem fokussierten Laserstrahl (Argonlaser, 488 nm) getroffen. Es kommt zur Anregung der von den Zellen gebundenen Fluorochrome (Daunorubicin, Daunoxome, Annexin V, PI) und zur Entstehung von Fluoreszenzsignalen. Durch die Lichtstreuung an der Zelle kommt es zur Entstehung von Streusignalen, wobei die Vorwärtstreuung der Größe der Zelle und die Seitwärtsstreuung der Granularität der Zelle entspricht. Photoröhren und Photodioden konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, die mit der Intensität des Lichtsignals korrelieren. Mit Hilfe eines Schwellenwertes werden Rausch- und Störsignale eliminiert [74]. Einen Überblick über den Aufbau des optischen Systems eines Durchflußzytometers gibt Abb. 7.

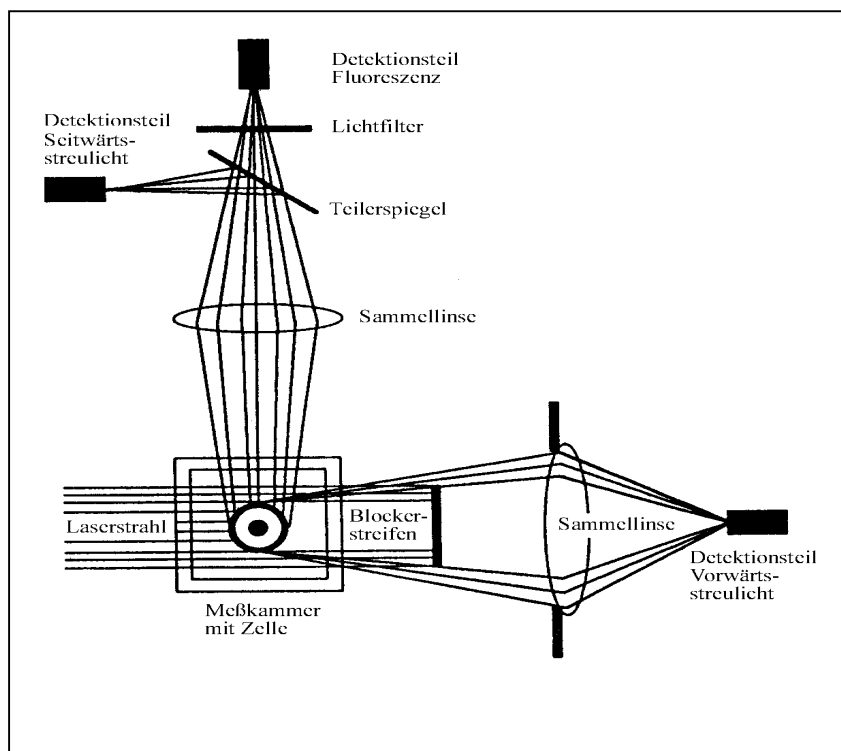


Abb. 7: Darstellung des optischen Systems eines Durchflußzytometers [aus Raffael, [74]]

Über die Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels Durchflußzytometrie lässt sich die intrazelluläre Konzentration der Substanzen messen. Dabei korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Konzentration des intrazellulär gebundenen Anthrazyklins [75]. Wird die Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und gegen

die Zeit aufgetragen, so kann die Einstrom- und Ausstromkinetik im entnommenen Zellgut untersucht werden. Die daraus resultierende Kurve zeigt einen Anstieg, eine Maximalhöhe und einen Ausstrom.

Die Festlegung eines Basiswertes geschieht mit Hilfe einer Negativkontrolle, die keinen Fluorochromzusatz enthält. Dadurch wird die Autofluoreszenz der Zellen bestimmt und von den Fluorochromsignalen abgegrenzt [74].

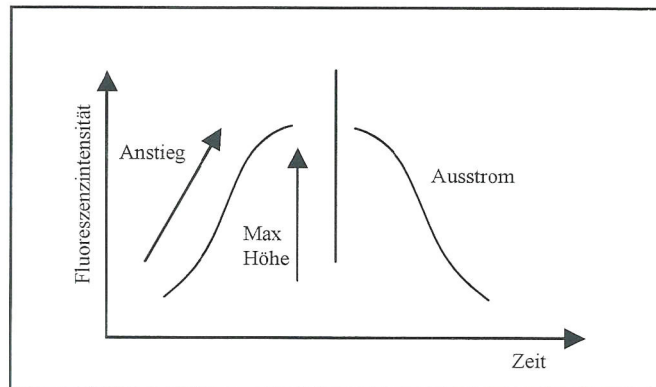


Abb. 8: Qualitative Darstellung von Fluoreszenzsignalen

### 3.4.2 Probenmessung und Datenauswertung

Bei der vorliegenden Arbeit erfolgten die Messungen mit einem Durchflußzytometer vom Typ FACSsort der Firma Becton Dickinson GmbH Heidelberg in Anlehnung an Raffael et al. [74] und Longobardi Givan et al. [76].

Die Geräteeinstellung wird mit fluoreszenzmarkierten Mikropartikeln (Mikrobeads: Calibrate 3, Becton Dickinson Worldwide, Inc.) durchgeführt.

Das Vorwärts/Seitwärts-Scatter wird linear dargestellt, die Fluoreszenzdaten (FL2) werden logarithmisch aufgezeichnet (siehe Abb. 9).

Die gemessenen Fluoreszenzsignale werden nicht nur in den für die Messung des Fluorochroms vorgesehenen Kanal, sondern in mehreren Kanälen registriert, was zu Messfehlern führen kann. Um diese zu kompensieren, wird ein gewisser Anteil des jeweiligen Fluoreszenzsignals in den Kanälen proportional zur Fluoreszenzintensität im eigentlich vorgesehenen Kanal subtrahiert. Dieser Vorgang heißt Kompensation. Sie wird regelmäßig mit einfach gefärbten Zellen oder Mikrobeads durchgeführt.

Es werden 5-10.000 Zellen bei einer Messrate von 30-50 Zellen/s gemessen (Messeinstellung „langsam“). Registriert werden die Fluoreszenzen im Kanal 2, der mit einem Filter (585/42 BP) ausgestattet ist.

Der Ablauf und die Auswertung mittels Cellquest Software werden bei jeder Messung gemäß eines Standardprotokolls beibehalten.

Bei den Invasions- und Evasionsversuchen wird wie folgt vorgegangen: Die gemessenen Lichtstreuungen werden zuerst im Forward/Sideward-Scatter (Vorwärts/Seitwärtsstreuung) dargestellt, um die Zellen nach ihrer Größe (Vorwärtsstreuung) und nach ihrer Granularität (Seitwärtsstreuung) festzulegen. Die zu messenden Zellen werden so eingegatet, dass nur die vitalen Zellen markiert werden, die sich bezüglich der Lichtstreuung als größere, wenig granulierte Zellen darstellen, (hier rot dargestellt). In einer zweiten Darstellung wird die Fluoreszenz der vitalen, vorher eingegateten Zellen gemessen (Abb. 9). Bei Zellproben, zu denen noch kein fluoreszierender Farbstoff zugesetzt ist, wird die Autofluoreszenz der Zellen dargestellt.

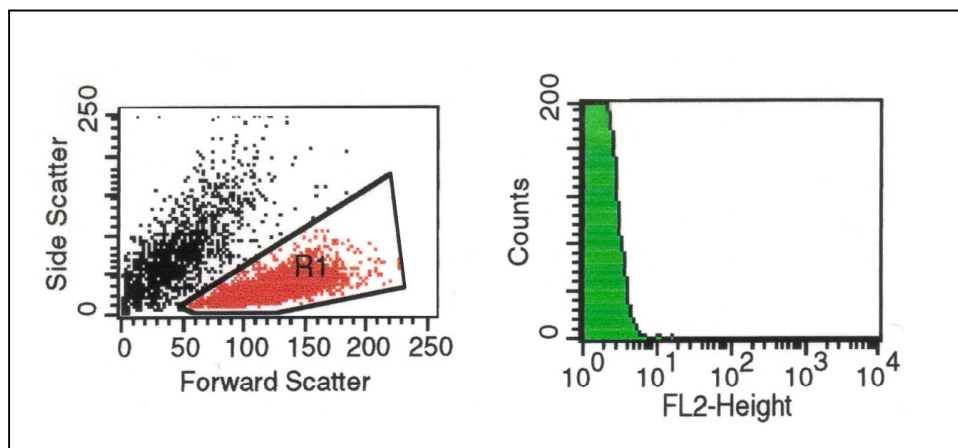


Abb. 9: Darstellung zur Abgrenzung der vitalen Zellen im Vorwärts/Seitwärts-Scatter und Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenz im FL2-Histogramm

Die Fluoreszenzintensität wird im so genannten Histogramm wiedergegeben. Hierbei wird die Häufigkeitsverteilung der Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität dargestellt. Als Intensität wird die mittlere Fluoreszenzintensität als „Mean Channel Number“ gemessen. Es handelt es sich um einen dimensionslosen Wert, der angibt, in welchem Intensitätskanal die meisten Zellen registriert werden. Somit sind zwar die Messwerte innerhalb der Versuche vergleichbar, stellen aber keine Absolutwerte dar. Anhand dieser Histogramme werden dann im zeitlichen Verlauf der Versuchsreihen die Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Diese werden in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und anhand der Kurven können die Parameter der Invasions- und Evasionskinetik (u.a. Anstiegsgeschwindigkeit, Höhe der Kurve, Ausstrom der Fluorochrome) bestimmt werden.

Danach erfolgt die Durchführung der Apoptoseversuche und die Darstellung der Messergebnisse im Dot Plot (siehe Abb. 10 zur Abgrenzung von apoptotischen Zellen von vitalen und nekrotischen).

Zum Vergleich der Apoptose bei Behandlung mit Daunorubicin oder Daunoxome werden auch bei diesen Versuchen die Fluoreszenzen in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

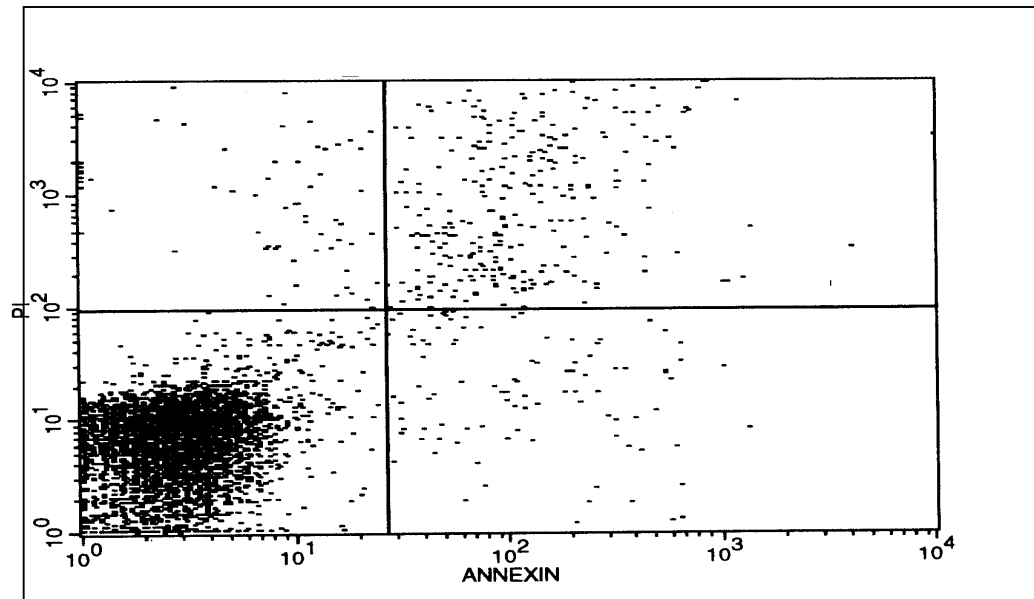


Abb. 10: Log Fluoreszenz Dot Plot von Annexin V und PI gefärbten CEM- Zellen, Trennung von vitalen (R1), apoptotischen (R2), und nekrotischen (R3) Zellen bei unbehandelten CEM-Zellen

### **3.5 Bestimmung der intrazellulären Verteilung mittels konfokaler Lasermikroskopie**

Um Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin aufweisen zu können, werden nach Inkubation von CEM-Zellen mit Daunorubicin oder Daunoxome lasermikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Dazu wird ein konfokales Lasermikroskop (Leica Microsystem-Wetzlar GmbH) mit einem Argon-Krypton Laser (488 nm) verwendet. Die Daten werden mittels SCANware ausgewertet.

Es werden drei Kulturflaschen mit 10 ml Zellsuspension gefüllt. Eine Flasche bleibt ohne Substanzzusatz als Kontrolle, in die anderen Kulturflaschen werden entweder Daunorubicin oder Daunoxome nach Vorverdünnung pipettiert. Die entstehende Endkonzentration beträgt 5 µg/ml.

Für die Untersuchungen werden nach 90, 180 und 360 Minuten und nach 24 Stunden Aliquote entnommen, aufgearbeitet und bildlich mittels Lasermikroskop festgehalten.

Der Ablauf ist folgender:

1. Abnahme von 500 µl Zellsuspension aller drei Kulturflaschen und Gabe in Reagenzröhrchen
2. Waschen mittels Zugabe von 2 ml 4°C gekühltem PBS und 5 min Zentrifugation bei 1000 U/min und 4°C
3. Dekantieren des Überstandes und Auffüllen des Zellpellets mit PBS (4°C gekühlt)
4. Erneutes Zentrifugieren und Resuspension mit 50 µl PBS
5. 2 Tropfen (ca. 50 µl) Zellpellet auf Objektglas pipettieren und leicht antrocknen lassen
6. Zugabe von Mounting Medium und Abdecken mittels Deckglas
7. Lasermikroskopische Untersuchung

Bis zur lasermikroskopischen Aufnahme müssen die Zellpellets in Dunkelheit und bei 4°C verwahrt werden, um weitere zellulär pharmakokinetische Vorgänge zu reduzieren [18].

Zwischen den einzelnen Abnahmen befinden sich die Kulturflaschen im Inkubator. Die Arbeitsschritte werden unter der Laminarflowbox durchgeführt.

### 3.5.1 Aufbau und Funktionsweise eines konfokalen Lasermikroskops

Seit 1987 ist das konfokale Lasermikroskop kommerziell erhältlich, nachdem jahrelang an der optischen und elektronischen Theorie geforscht wurde. Es eignet sich hervorragend zur Darstellung von biologischen Substanzen, da es möglich ist, dünne optische Scheiben aus komplexen Objekten zu schneiden und diese darzustellen. Dadurch werden tieferliegende Gewebeschichten ebenfalls erfasst [77,78].

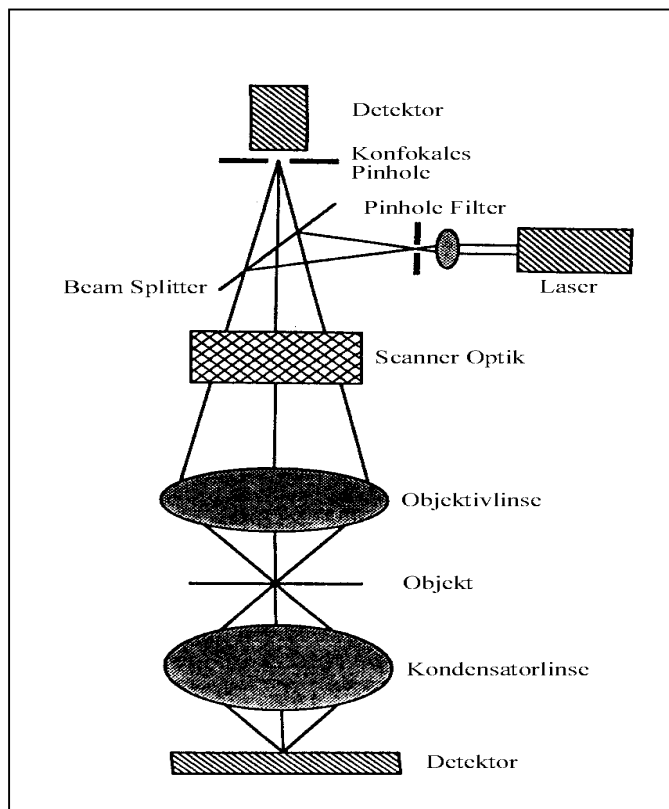


Abb. 11 zeigt den Aufbau des optischen Systems eines Lasermikroskops.

*Abb. 11: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Lasermikroskops*

Das Licht eines Lasers (in der vorliegenden Arbeit ein Argon-Krypton-Laser mit einer Emissionswellenlänge von 275-528 nm) wird durch eine Objektivlinse konvergiert und auf ein Objekt fokussiert. Der Scanner deflektiert den Strahl und scannt den fokussierten Punkt des Objekts. Das reflektierte Licht kommt zurück, läuft wieder durch den Scanner, wird durch den „Beam Splitter“ separiert und auf das Zentrum des „Pinholes“ zentriert. Der Punkt im Pinhole konjugiert mit dem Punkt auf dem Objekt und wird deshalb „konfokaler Punkt“ genannt.

---

Die Lichtintensität, die das Pinhole durchläuft, wird durch einen photoelektronischen Sensor, z.B. eine Silikon Photodiode, aufgenommen und verarbeitet.

Das transmittierte Licht wird durch eine Kondenslinse gesammelt und mittels eines anderen Sensors detektiert. Dieser Sensor ist groß, um den gesamten transmittierten Strahl zu erfassen.

Diese konfokalen Effekte bringen deshalb gegenüber der konventionellen Mikroskopie Verbesserungen in der lateralen und axialen Auflösung mit sich.

Das Bild wird durch Scannen des fokussierten Punkts des Objekts aufgebaut und dann im Computer mittels Software verarbeitet und gespeichert [79,80,81,82].

## **4. Ergebnisse**

Im folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Versuche dargestellt. Jede Versuchsreihe ist dreimal wiederholt worden, und die Ergebnisse sind reproduzierbar.

Zuerst werden die Ergebnisse der Versuche zur Invasionskinetik, dann die der Versuche zur Evasionskinetik, die mittels Durchflußzytometrie durchgeführt wurden, graphisch und tabellarisch dargestellt und die zelluläre Pharmakokinetik von Daunorubicin und Daunoxome miteinander verglichen. Anschließend werden die Ergebnisse der Apoptoseversuche, die ebenfalls mittels Durchflußzytometrie durchgeführt wurden, vorgestellt. Diese werden ebenfalls tabellarisch und graphisch dargestellt. Ebenfalls werden die Unterschiede der Ergebnisse von Daunorubicin und Daunoxome miteinander verglichen. Außerdem werden morphologische Veränderungen durch die Apoptose mittels Lichtmikroskopie bildlich festgehalten und aufgezeigt.

Zuletzt werden die Ergebnisse der Untersuchung zur intrazellulären Verteilung von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin in den CEM-Zellen mittels Lasermikroskopie bildlich dargestellt und miteinander verglichen.

### **4.1 Ergebnisse der mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Versuche zur Invasionskinetik**

Für den Vergleich der zellulären Pharmakokinetik von Daunorubicin und Daunoxome stellt die Invasionskinetik einen wichtigen Bestandteil dar. Hierbei spiegelt die gemessene Fluoreszenzintensität die intrazelluläre Konzentration der Substanzen wider.

Diese Kinetik beschreibt, wie schnell die beiden Anthrazykline in die Zellen einströmen und wann sie ihr Plateau erreichen. Desweiteren soll geklärt werden, ob die Invasionskinetik konzentrationsabhängig oder auch zeitabhängig ist. Ebenfalls ist von Interesse, ob sich die Kurvenverläufe der Invasion von Daunorubicin und Daunoxome unterscheiden.

Dazu werden die unter 3.2.1 beschriebenen Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind anhand eines repräsentativen Versuchs in Tab. 1 und graphisch in Abb. 12 dargestellt.



Tab. 1: Darstellung der Ergebnisse eines Invasionsversuchs mittels Durchflußzytometrie, Abhängigkeit der Fluoreszenzen (Einheit "Mean Channel Number") von Daunorubicin und Daunoxome in drei Konzentrationen von der Inkubationszeit (in min)

Zeit in min	0	30	60	120	180	360	540
Fluoreszenz							
Kontrolle	1,74	1,72	1,69	1,70	1,70	1,79	1,38
Daunorubicin 1 µg/ml	1,73	7,63	13,79	26,07	33,44	37,54	32,0
Dau 5 µg/ml	1,75	34,84	64,40	128,07	163,93	169,00	159,46
Dau 10 µg/ml	1,76	94,05	175,01	274,83	326,72	313,93	269,41
Daunoxome 1 µg/ml	1,74	3,10	3,99	8,26	14,23	30,12	30,48
Dx 5 µg/ml	1,75	8,00	12,96	36,83	72,12	157,31	158,10
Dx 10 µg/ml	1,76	14,30	27,71	75,38	151,69	258,61	266,59

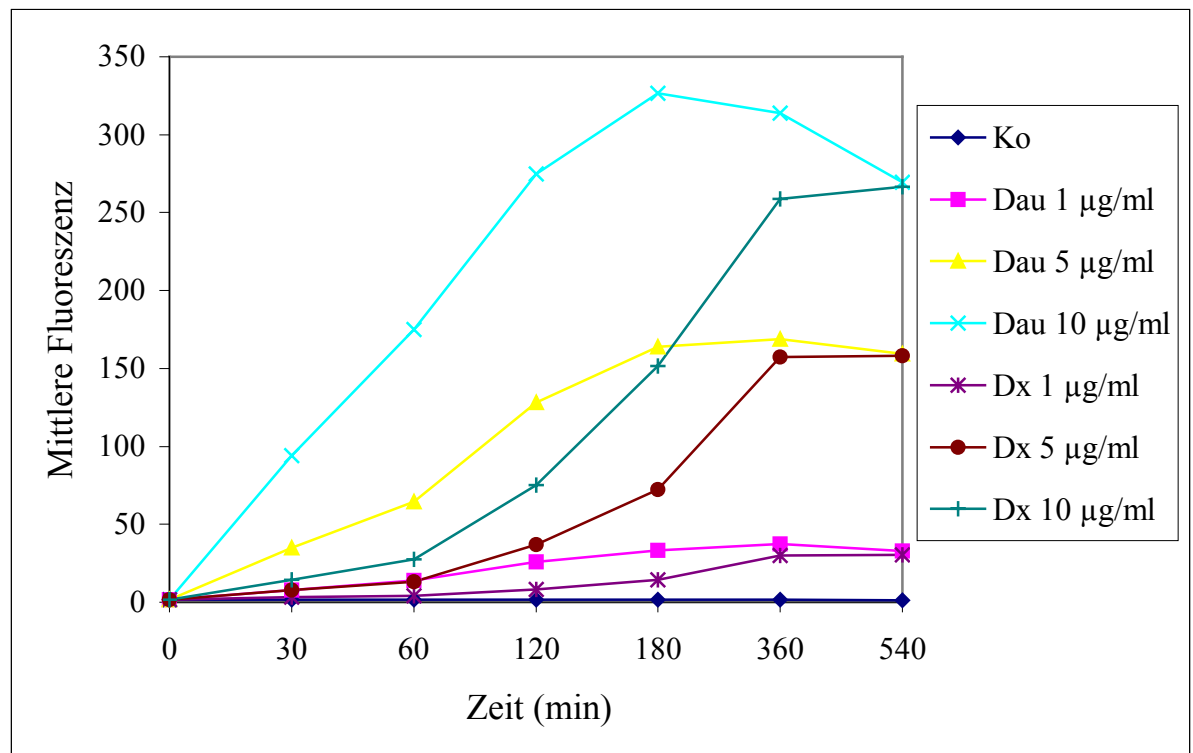


Abb. 12: Zunahme der Fluoreszenzintensitäten der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit

Wie aus Tab. 1 und der Abb. 12 ersichtlich wird, steigt die Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit Daunorubicin in allen drei Konzentrationen steil an. Dies bedeutet, dass Daunorubicin mit hoher Geschwindigkeit in die Zellen einströmt.

Besonders deutlich wird dies anhand der Kurve von freiem Daunorubicin in der Konzentration 10 µg/ml. Die Kurve verläuft sehr steil, erreicht ihr Plateau nach 180 min und erreicht die höchsten maximalen Konzentrationen.

Anhand der Kurven von 5 µg/ml Daunorubicin ist dies ebenfalls zu erkennen. Die Fluoreszenz Daunorubicins steigt schnell und steil an und erreicht ihr Maximum nach 180 min, die maximalen Werte von 10 µg/ml Daunorubicin werden jedoch nicht erreicht.

Die Kurve von 1 µg/ml freiem Daunorubicin zeigt auf, dass Daunorubicin schnell in die Zellen einströmt und ebenfalls nach 180 min ein Plateau erreicht. Die Maximalwerte liegen aber noch niedriger als bei Daunorubicin 5 µg/ml.

Der Kurvenverlauf der Invasion von freiem Daunorubicin gestaltet sich für alle Konzentrationen gleich. Bis zum Erreichen des Gleichgewichts verlaufen alle Kurven annähernd linear und folgen einer Sättigungskinetik.

Anhand der Kurven zur Invasionskinetik von liposomal verkapseltem Daunorubicin wird ersichtlich, dass Daunoxome deutlich langsamer in die Zellen einströmt.

Dies ist anhand der Kurve von Daunoxome 10 µg/ml gut zu erkennen. Daunoxome strömt zunächst langsamer ein und erlangt erst nach 120 min eine schnellere Einstromgeschwindigkeit. Ein Plateau wird nach den Inkubationszeiten der Versuchsreihe nicht erreicht, aber ebenfalls die Maximalwerte von Daunorubicin 10 µg/ml nach 360-540 min.

Daunoxome 5 µg/ml strömt anfangs ebenfalls langsamer ein, später schneller. Es wird kein Plateau erreicht, aber nach 540 min die gleichen Maximalwerte wie Daunorubicin 5 µg/ml.

Dies ist ebenfalls anhand der Kurven von Daunoxome 1 µg/ml zu erkennen.

Die Kurven der Invasionskinetik verlaufen für alle drei Konzentrationen Daunoxome sigmoidförmig.

Daraus ergibt sich, dass der initiale Einstrom von Daunorubicin schneller verläuft als der von Daunoxome, es aber in der Akkumulation der zu Versuchsende maximal erreichten Konzentration keinen signifikanten Unterschied gibt. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Einstromgeschwindigkeit zeitabhängig und konzentrationsabhängig ist.

Bei der Kontrolluntersuchung sind überhaupt keine Veränderungen der Fluoreszenzen zu verzeichnen.

Wie bereits erwähnt, verlaufen die Kurven von Daunorubicin und Daunoxome unterschiedlich. Der Kurvenverlauf des freien Daunorubicins folgt einer Sättigungskinetik mit einem steilen, annähernd linearen Anstieg und Erreichen eines Plateaus, während der des liposomal verkapselten sigmoid verläuft mit anfangs langsameren, später erst steilerem Anstieg.

Daraus ergibt sich die Frage, welche Unterschiede die anfängliche und die maximale Einstromgeschwindigkeiten der beiden Substanzen aufweisen.

Um diese besser aufzeigen zu können, ist es sinnvoll, die Anfangsgeschwindigkeit ( $V_{30}$ ) und die maximale Geschwindigkeit ( $V_{max}$ ) der Invasion zu bestimmen und graphisch und tabellarisch darzustellen [18].

Diese Berechnungen werden anhand der einzelnen Invasionskurven von Daunorubicin und Daunoxome in allen drei Konzentrationen und mittels der Formeln aus 3.2.1 durchgeführt (siehe Abb. 13 und Tab. 2 und Tab. 3).

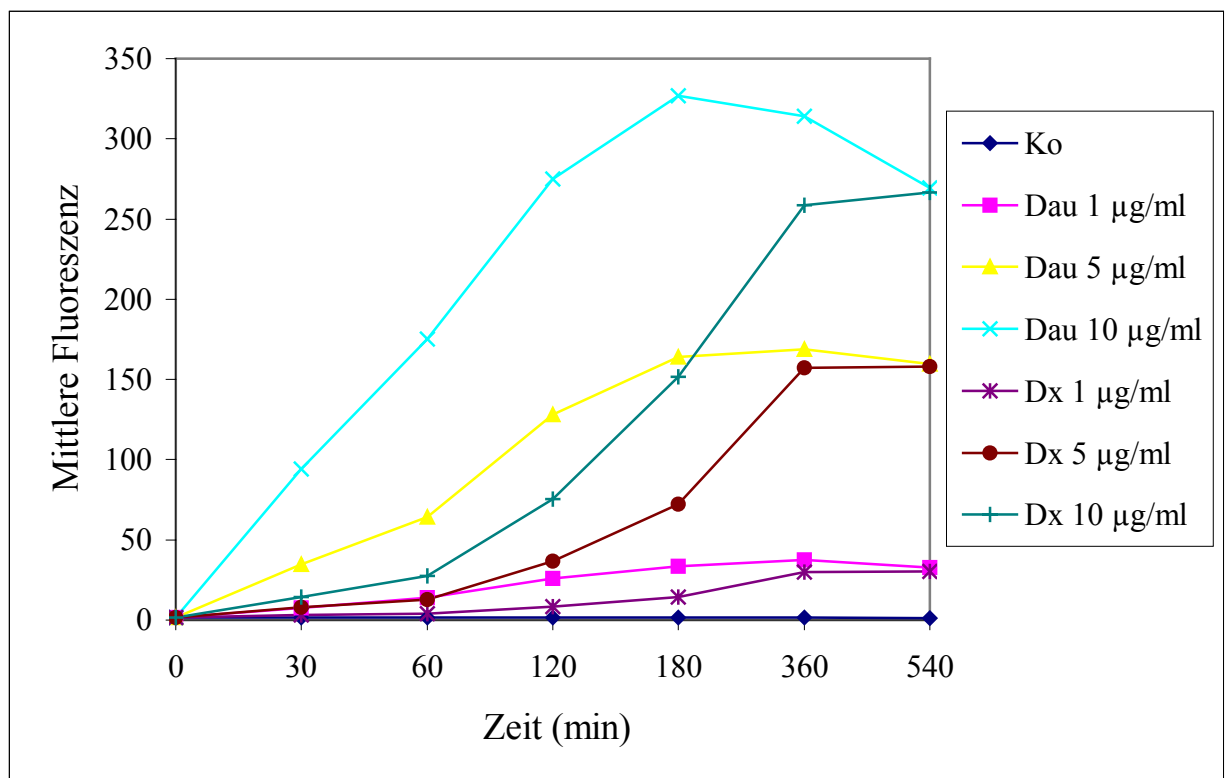


Abb. 13: Beispiel zur Bestimmung von  $V_{30}$  und  $V_{max}$  anhand der Kurven der Invasionskinetik von Daunorubicin und Daunoxome in drei unterschiedlichen Konzentrationen anhand der Formeln aus 3.2.

Tab. 2: Vergleich der Ergebnisse der  $V_{30}$ -Bestimmung von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  anhand der Invasionsversuche

	Dauno 1 $\mu\text{g/ml}$	Dx 1 $\mu\text{g/ml}$	Dauno 5 $\mu\text{g/ml}$	Dx 5 $\mu\text{g/ml}$	Dauno 10 $\mu\text{g/ml}$	Dx 10 $\mu\text{g/ml}$
1. Invasionsversuch	0,16	0,06	-	-	2,90	0,30
2. Invasionsversuch	0,20	0,05	1,10	0,21	3,10	0,42
3. Invasionsversuch	0,26	0,06	1,58	0,27	3,31	0,41

Tab. 3: Vergleich der Ergebnisse der  $V_{\text{max}}$ -Bestimmung von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  anhand der Invasionsversuche

	Dauno 1 $\mu\text{g/ml}$	Dx 1 $\mu\text{g/ml}$	Dauno 5 $\mu\text{g/ml}$	Dx 5 $\mu\text{g/ml}$	Dauno 10 $\mu\text{g/ml}$	Dx 10 $\mu\text{g/ml}$
1. Invasionsversuch	0,18	0,10	-	-	2,90	0,54
2. Invasionsversuch	0,20	0,09	1,16	0,47	3,10	0,59
3. Invasionsversuch	0,26	0,08	1,58	0,35	3,34	0,41

Die errechneten Werte (siehe Tab. 2) für die Anfangsgeschwindigkeit innerhalb der ersten 30 min nach Inkubation von Daunorubicin und Daunoxome zeigen, dass Daunorubicin in allen drei Konzentrationen mit einer deutlich höheren Anfangsgeschwindigkeit in die Zellen einströmt als Daunoxome in den entsprechenden Konzentrationen. Die Höhe der Geschwindigkeit ist abhängig von der extrazellulären Konzentration.

Die Werte für das liposomal verkapselte Daunorubicin zeigen die gleiche Konzentrationsabhängigkeit, erreichen aber in keiner Konzentration ebenso hohe Werte wie Daunorubicin. Daunoxome strömt demnach während der ersten 30 min nach Inkubation mit langsamerer Geschwindigkeit in die Zellen ein als Daunorubicin. Auch hier zeigt sich, dass Daunoxome 10  $\mu\text{g/ml}$  höhere Invasionsgeschwindigkeiten aufweist als Daunoxome 5  $\mu\text{g/ml}$  und als Daunoxome 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Die Werte für die maximale Geschwindigkeit (Tab. 3) von Daunorubicin und Daunoxome zeigen, dass Daunorubicin neben einer höheren Anfangsgeschwindigkeit auch eine höhere maximale Einstromgeschwindigkeit aufweist als Daunoxome. Auch diese Werte sind konzentrationsabhängig, 10  $\mu\text{g/ml}$  Daunorubicin weist die höchsten Werte auf, gefolgt von 5  $\mu\text{g/ml}$  Daunorubicin und 1  $\mu\text{g/ml}$  Daunorubicin. Der maximale Einstrom von

Daunoxome ist ebenfalls konzentrationsabhängig, erreicht aber wie die Anfangsgeschwindigkeit nicht die Werte von Daunorubicin.

Ebenfalls ist deutlich zu erkennen, dass die initiale und die maximale Einstromgeschwindigkeiten für Daunorubicin fast identisch sind. Dies bedeutet, dass der maximale Einstrom von freiem Daunorubicin in allen Konzentrationen in den ersten 30 min nach Inkubation stattfindet. Außerdem ist zu sehen, dass ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Einstromgeschwindigkeit und der extrazellulären Konzentration besteht.

Bei Daunoxome ist der initiale Einstrom nicht identisch mit der maximalen Konzentration, diese liegt hier zwischen der 180-360sten min nach Inkubation.

Obwohl Daunoxome in der vorgegebenen Versuchszeit kein Plateau erreicht, werden die Invasionsversuche nur über einen Zeitraum von 540 min durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass die Zellen bei längerer Versuchsdauer vermehrt zu Apoptose und Nekrose neigen (Abb. 14). Dies wurde deutlich anhand des einmalig durchgeführten Invasionsversuchs über 720 min (nicht dargestellt). Dabei kam es nach 540 min besonders bei den höheren Konzentrationen zu einem Abfall des Kurvenverlaufs, was auf Zellruption bei Apoptose und Nekrose zurückzuführen sein könnte und dadurch nicht verwertbaren Daten hervorbrachte (siehe auch Abb. 14). Daraufhin wurde die Versuchsdauer für alle weiteren Versuche von 720 min auf 540 min festgesetzt.

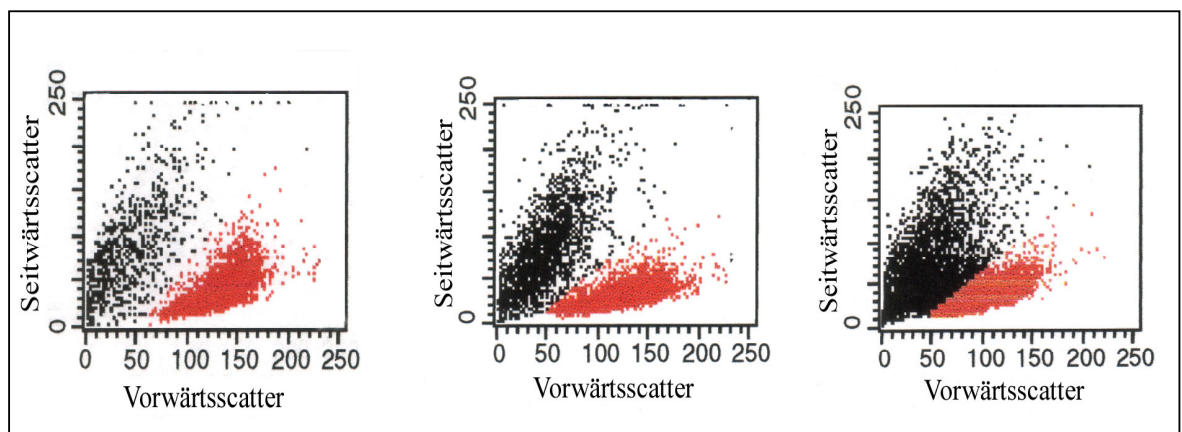


Abb. 14: Darstellung der apoptotischen (schwarz markiert) und vitalen (rot markiert) Zellen im Vorwärts/Seitwärts-Scatter bei Inkubation mit 10 µg/ml Daunorubicin im Verlauf von 0 min, 180 min und 540 min

## 4.2 Ergebnisse der mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Versuche zur Evasionskinetik

Neben der Invasion stellt die Evasion einen wichtigen Bestandteil der zellulären Pharmakokinetik dar.

Hierbei wird untersucht, wie die Evasion abläuft, wie schnell freies bzw. liposomal verkapseltes Daunorubicin aus den Zellen strömt und ob dies abhängig ist von der extrazellulären Konzentration oder von der Zeit. Auch hier entsprechen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der intrazellulären Konzentration der Substanzen.

Die Versuche werden nach 3.2.2 durchgeführt, die Ergebnisse werden in Tab. 4 und in Abb. 15 dargestellt.

*Tab. 4: Darstellung der Ergebnisse eines Evasionsversuchs mittels Durchflußzytometrie, Abhängigkeit der Fluoreszenzen (Einheit „Mean Channel Number“) von Daunorubicin und Daunoxome in drei Konzentrationen von der Inkubationszeit (in Minuten)*

<b>Zeit in min</b> Fluoreszenz	0	60	120	180	300
Kontrolle	1,61	1,62	1,64	1,66	1,63
Daunorubicin 1 µg/ml	17,01	18,23	18,02	19,91	18,62
Dau 5 µg/ml	77,70	73,52	70,99	71,78	69,63
Dau10 µg/ml	144,33	128,76	123,64	121,55	118,27
Daunoxome 1 µg/ml	6,89	7,30	7,40	8,99	9,08
Dx 5 µg/ml	27,63	28,60	28,73	30,63	28,82
Dx 10 µg/ml	45,72	47,01	47,17	46,98	44,32

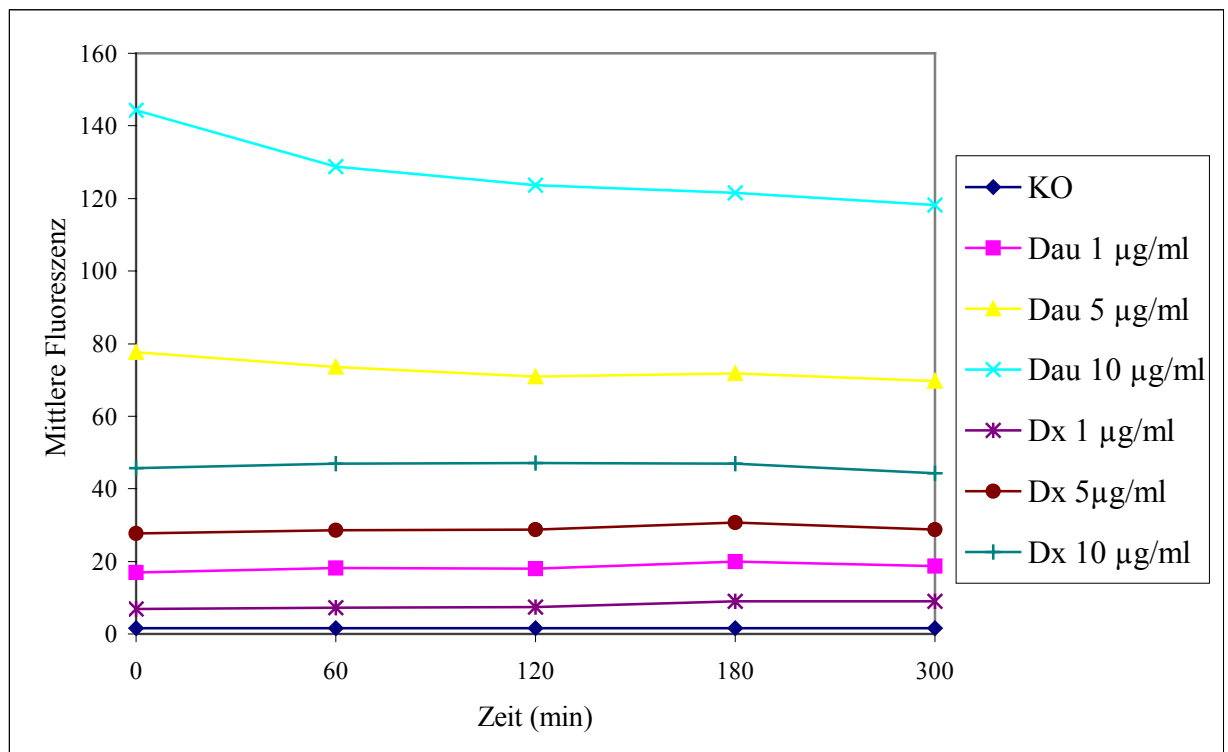


Abb. 15: Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensitäten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml in Abhängigkeit von der Zeit

Tab. 4 und Abb. 15 zeigen, dass auch der Efflux von Daunorubicin und Daunoxome große Unterschiede aufweist. Daunorubicin 10 µg/ml folgt einer biphasischen Evasion. Bis 60 min nach der zweistündigen Inkubation erfolgt der Ausstrom relativ schnell, über die weitere Versuchszeit sehr langsam. Diese biphasische Evasionskinetik ist ebenfalls bei Daunorubicin 5 µg/ml zu beobachten. Nach einem schnelleren Ausstrom in den ersten 60 min nach Inkubation folgt ein sehr langsamer Ausstrom über die verbleibende Versuchszeit. Diese Kinetik tritt bei Daunorubicin 1 µg/ml nicht mehr auf, es kommt zu einem sehr langsamen Ausstrom über die gesamte Zeit. Während bei höheren Konzentrationen Daunorubicin einen biphasischen Evasionsverlauf aufweist, verhält er sich bei niedrigen Konzentrationen monophasisch.

Es zeigt sich hier eine Konzentrationsabhängigkeit der Evasion.

Daunoxome zeigt sehr geringe Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten über die Zeit auf. Es kommt zu keinem signifikanten Ausstrom aus den Zellen bei 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml Daunoxome. Dies bedeutet, dass die Evasionskinetik für Daunoxome in allen Konzentrationen monophasisch verläuft und nicht konzentrationsabhängig ist.

Die Inkubationszeit von zwei Stunden wird gewählt, da es zu diesem Zeitpunkt bei freiem und auch bei liposomal verkapseltem Daunorubicin zu einem ausreichenden Einstrom der Substanzen in die Zellen gekommen ist. Die Substanzen sind aber noch nicht irreversibel

---

an den Kern oder an Subkompartimente gebunden, weshalb es noch zu Umverteilungsvorgängen kommen kann. Zusätzlich ist der Anteil von apoptotischen und nekrotischen Zellen gegenüber den vitalen noch niedrig, um gut verwertbare Daten zu erlangen.

#### **4.3 Ergebnisse der mittels Durchflußzytometrie durchgeführten Versuche zur Kinetik der Apoptoseinduktion**

Sowohl bei den Invasionsversuchen als auch bei den Evasionsversuchen werden mit zunehmender Versuchsdauer und höheren extrazellulären Konzentrationen beider Substanzen avitale Zellen beobachtet. Daraus ergibt sich die Frage, ob es sich um apoptotische oder nekrotische Zellen handelt. Zur Bestimmung bietet sich der Apoptoseversuch mit Zweifachfärbung durch Annexin V und PI (Propidium Iodid) an. Durch die hohe Affinität von Annexin V zu apoptotischen Zellen kann quantitativ der Prozentsatz der Zellen bestimmt werden, der apoptotisch ist, da diese Zellen Annexin V binden und PI ausschließen. Hierfür werden die Versuche aus 3.2.3 durchgeführt. Es soll dabei auch ermittelt werden, ob die durch Daunorubicin und Daunoxome verursachte Apoptose abhängig ist von der extrazellulären Konzentration und wie sich die Anzahl der apoptotischen Zellen über die Zeit verhält.

Die Ergebnisse werden in Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19 dargestellt.



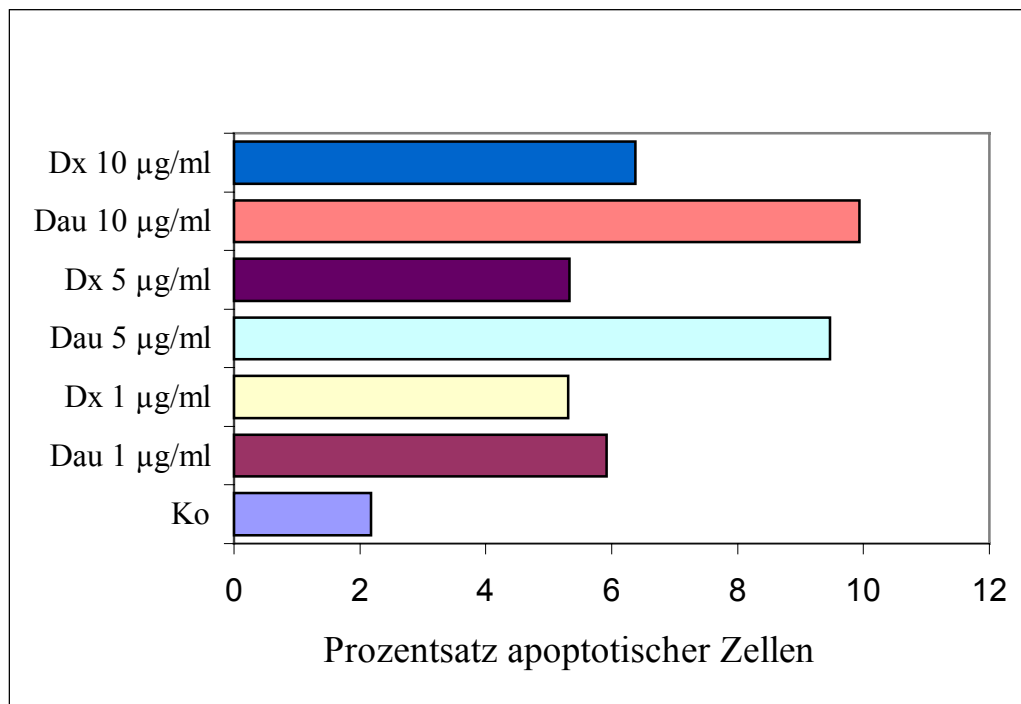


Abb. 16: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 120 min Inkubation

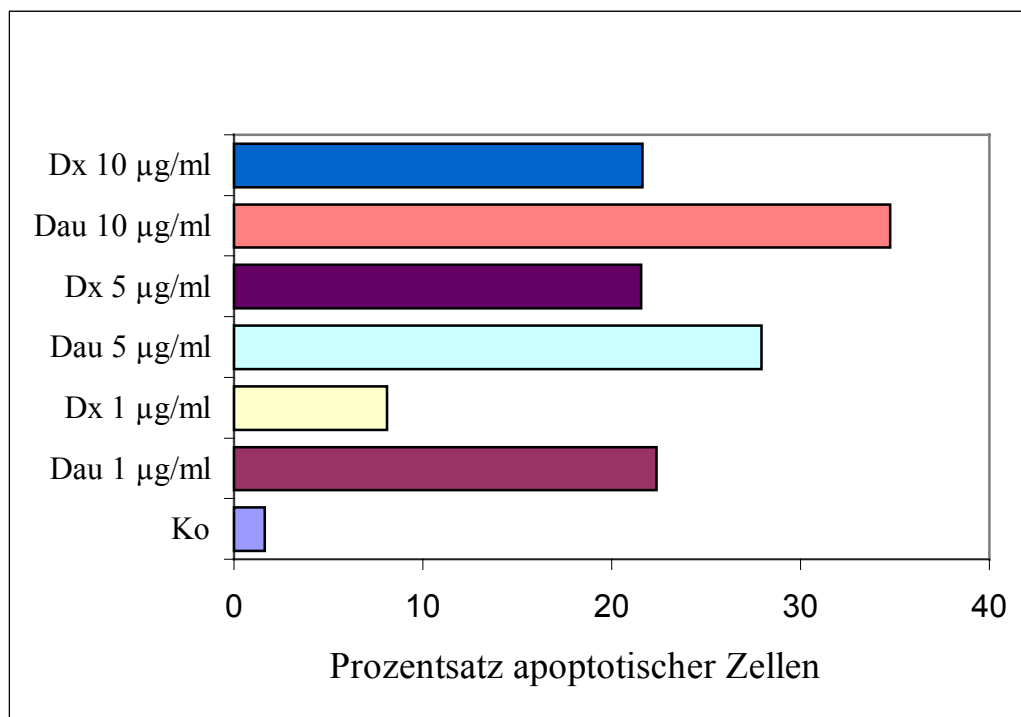


Abb. 17: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 240 min Inkubation

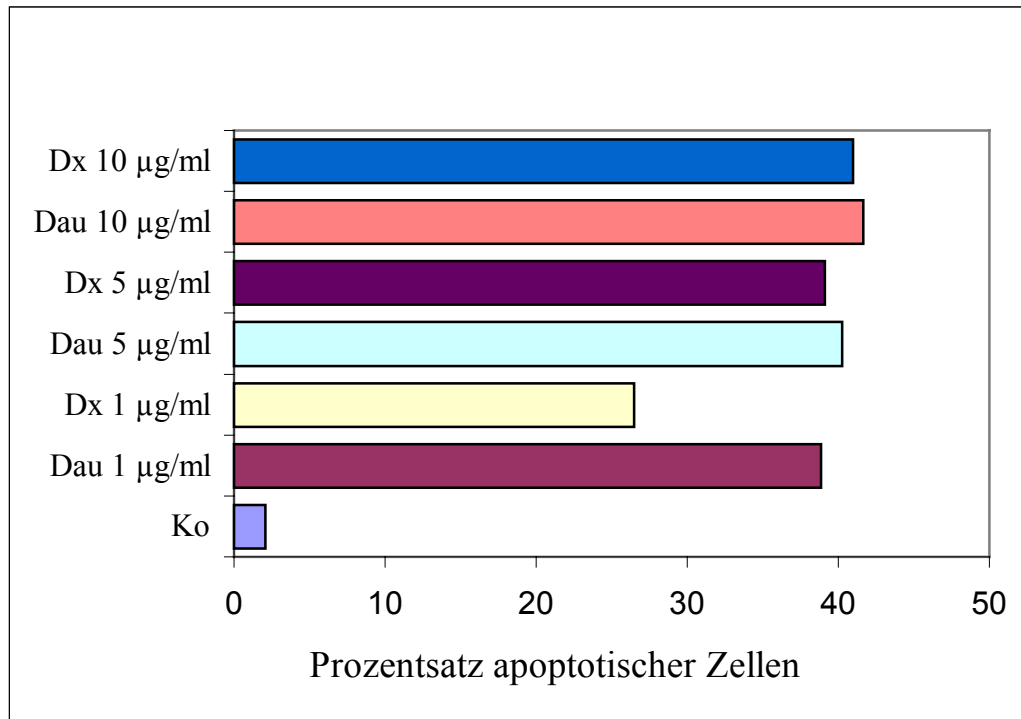


Abb. 18: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 360 min Inkubation

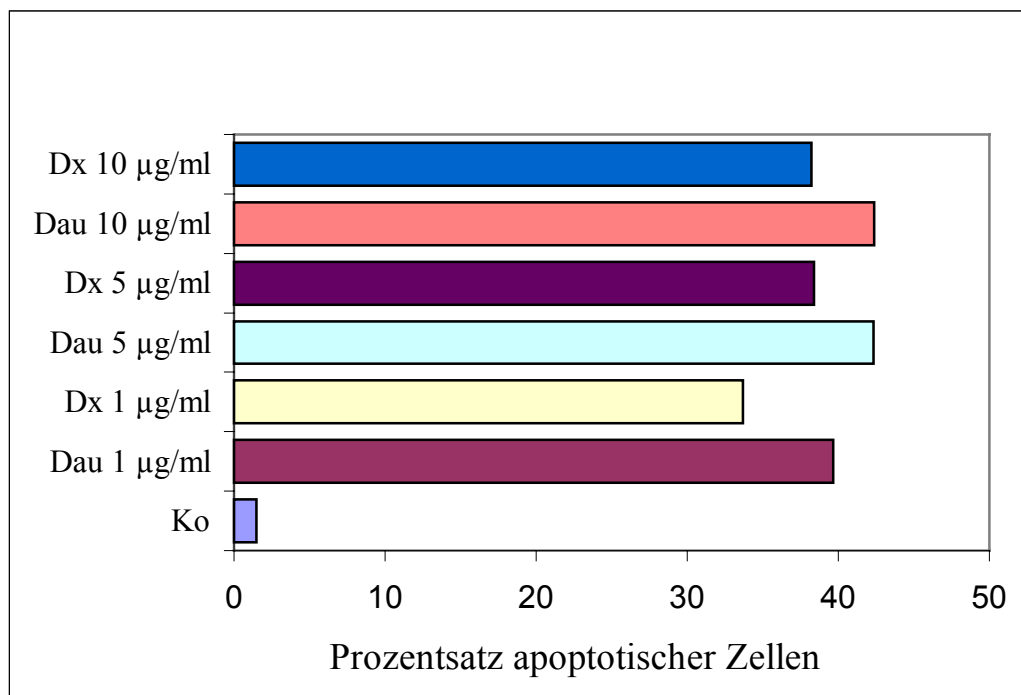


Abb. 19: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 480 min Inkubation

Aus den Abb. 16-19 wird ersichtlich, dass auch in der Kinetik der Apoptoseinduktion Unterschiede zwischen freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin bestehen.

Bei Daunorubicin werden bereits nach 120 min (Abb. 16) apoptotische Zellen nachgewiesen. Daunorubicin 10 µg/ml weist die höchste Apoptoserate auf, gefolgt von Daunorubicin 5 µg/ml. Daunorubicin 1 µg/ml weist deutlich niedrigere Werte auf als diese beiden, aber höhere Werte als Daunoxome 5 µg/ml und Daunoxome 1 µg/ml.

Daunoxome 10 µg/ml induziert nach 120 min mehr Apoptose als Daunoxome 5 µg/ml und Daunoxome 1 µg/ml, aber weniger als Daunorubicin 5 und 10 µg/ml.

Nach 240 min (Abb. 17) findet bei allen Konzentrationen von Daunorubicin und Daunoxome eine deutliche Zunahme der Apoptose statt. Daunorubicin weist höhere Werte auf als Daunoxome, wobei Daunorubicin 10 µg/ml am meisten Apoptose induziert, gefolgt von Daunorubicin 5 µg/ml und Daunorubicin 1 µg/ml. Daunoxome 10 µg/ml und 5 µg/ml weisen ebenso hohe Werte auf wie Daunorubicin 1 µg/ml, dahingegen weist Daunoxome 1 µg/ml noch deutlich geringere Werte auf.

Nach 360 min (Abb. 18) kommt es wieder zu einer deutlichen Zunahme der Apoptose sowohl bei Daunorubicin als auch bei Daunoxome. Die Werte aller drei Konzentrationen von Daunorubicin gleichen sich an. Es bestehen nur noch geringe Unterschiede in der Apoptoseinduktion.

Ebenfalls nehmen die Apoptoseraten von Daunoxome 10 µg/ml und 5 µg/ml stark zu und weisen keine deutliche Differenzen zu den Werten von Daunorubicin auf. Daunoxome 1 µg/ml ruft noch weniger Apoptose hervor.

Nach 480 min (Abb. 19) kommt es zu einer allgemeinen Angleichung aller Apoptoseraten. Die Apoptosewerte von Daunorubicin 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml gleichen sich wie schon nach 360 min beobachtet einander an.

Auch die Werte von Daunoxome in allen drei Konzentrationen gleichen sich untereinander an. Daunoxome 1 µg/ml erreicht ebenfalls deutlich höhere Werte. Insgesamt bestehen keine deutlichen Differenzen mehr zwischen der Apoptoseinduktion von Daunorubicin und Daunoxome nach 480 min.

Bei den Kontrollen kommt es über die gesamte Versuchszeit zu keiner Zunahme der Apoptoseraten, d.h. es findet keine Apoptoseinduktion statt.

Abb. 20 zeigt zusammenfassend den Verlauf des Anteils apoptotischer Zellen für Daunorubicin und Daunoxome in den drei Konzentrationen.

Wie schon in den Abbildungen 16-19 wird ersichtlich, dass Daunorubicin 10 µg/ml und Daunorubicin 5 µg/ml deutlich schneller und mehr Apoptose induzieren als Daunorubicin

1  $\mu\text{g/ml}$  und Daunoxome in allen drei Konzentrationen. Sowohl nach 120 min als auch nach 240 min liegen die Werte für Daunorubicin 10  $\mu\text{g/ml}$  und 5  $\mu\text{g/ml}$  höher.

Daunorubicin 1  $\mu\text{g/ml}$  und Daunoxome 10  $\mu\text{g/ml}$  und 5  $\mu\text{g/ml}$  folgen einem ähnlichen Verlauf in den ersten 240 min nach Inkubation.

Nach 360 min erreichen dann Daunorubicin 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  und Daunoxome 10  $\mu\text{g/ml}$  und 5  $\mu\text{g/ml}$  ein gemeinsames Maximum in der Apoptoseinduktion.

Daunoxome 1  $\mu\text{g/ml}$  induziert bis zu 360 min nach Inkubation deutlich weniger Apoptose als Daunorubicin und Daunoxome in allen anderen Konzentrationen, erreicht aber nach 480 min annähernd gleiche Werte wie diese.

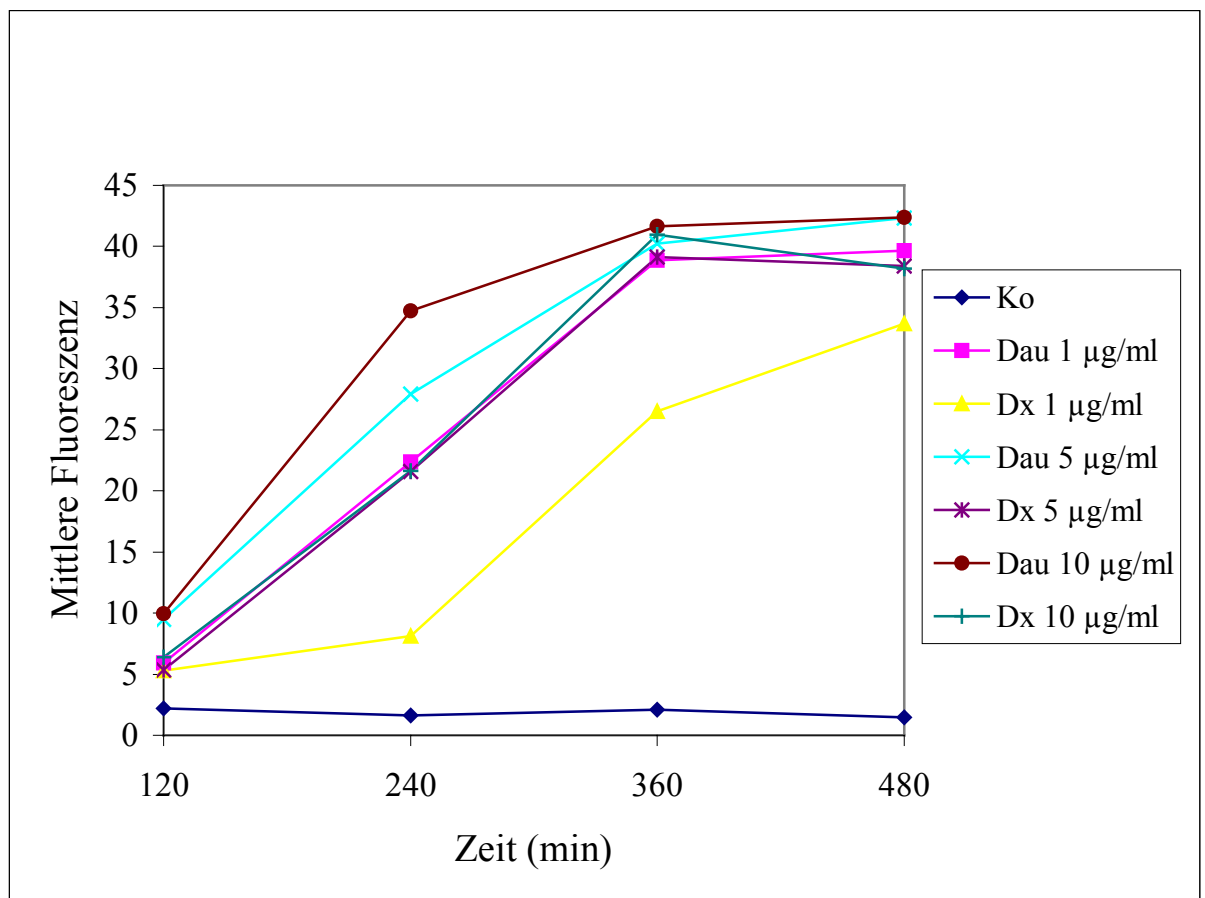


Abb. 20: Darstellung des Verlaufs aller Apoptosewerte von Daunorubicin und Daunoxome 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  in einem Liniendiagramm

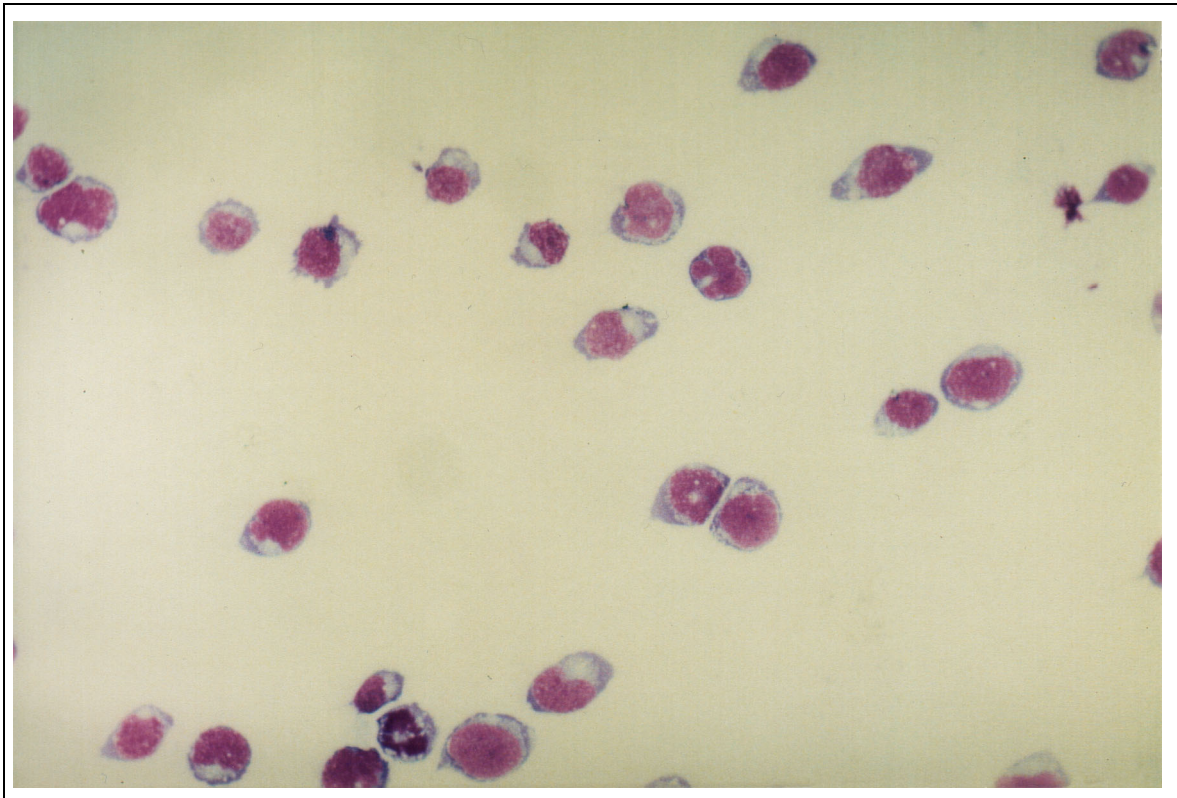
#### 4.4 Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose anhand von Lichtmikroskopie

Obwohl die Durchflußzytometrie als das Mittel der Wahl zur Bestimmung von Apoptose angesehen ist, wird allgemein die Meinung vertreten, dass die Kombination mit der Mikroskopie die besten Ergebnisse erbringt [19,61,65]. Die einzigartig morphologischen Veränderungen der Apoptose können bildhaft dargestellt werden und unterstützen dadurch die Unterscheidung zwischen apoptotischen und anderen Zellen.

Die Versuche werden nach 3.3 durchgeführt und die Aufnahmen hier dargestellt.

Es ergeben sich keine morphologischen Veränderungen in den Kontrollpräparaten. Die entstehenden Veränderungen der Apoptose zeigen weder zwischen Daunorubicin und Daunoxome noch den einzelnen Konzentrationen (1, 5 und 10 µg/ml) der beiden Substanzen Unterschiede auf. Deshalb werden die apoptotischen Veränderungen zusammen aufgezeigt.

Abb. 4.10 zeigt eine Übersichtsaufnahme von der Kontrollgruppe mit CEM-Zellen. Es sind nur vitale Zellen zu sehen ohne Anzeichen von apoptotischen Veränderungen.

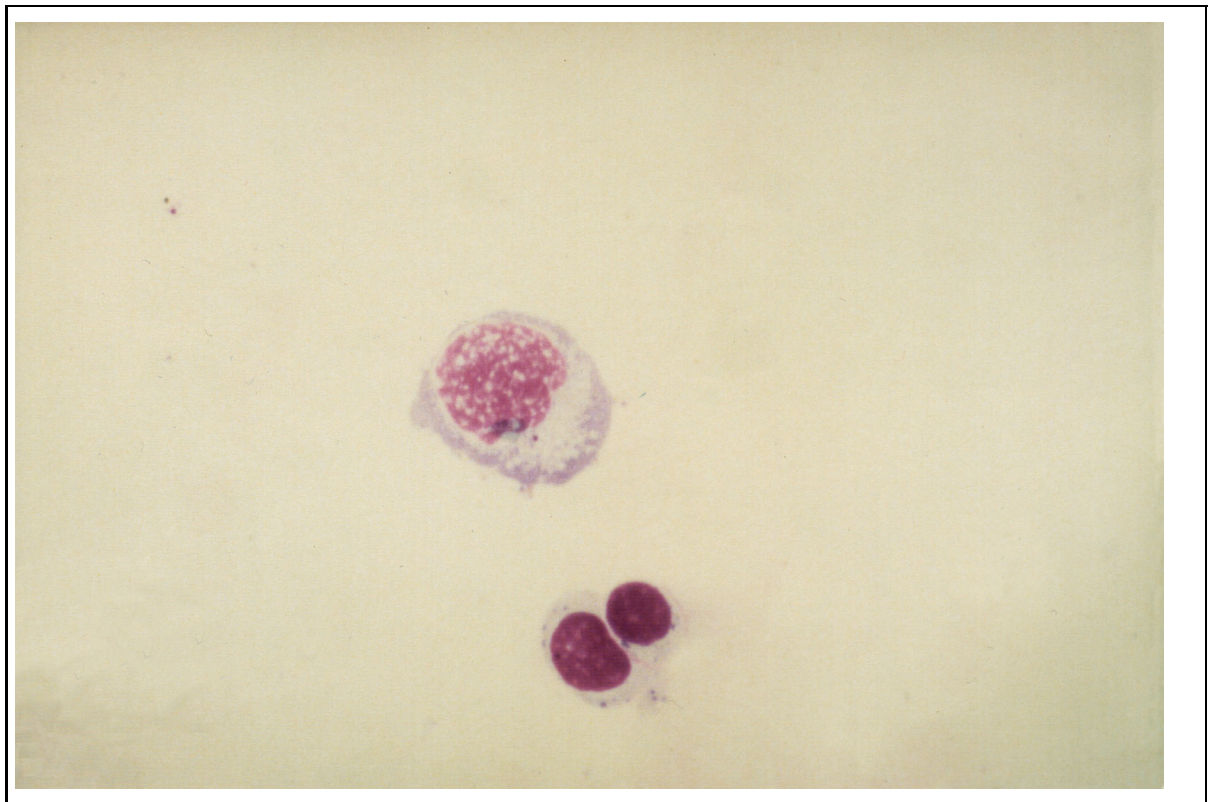


*Abb. 21: Darstellung einer Übersicht von vitalen CEM-Zellen, es zeigen sich keine Anzeichen von typisch morphologischen Veränderungen während der Apoptose*

Abb. 22 zeigt eine unveränderte vitale Zelle (obere einzelne Zelle) und zwei apoptotische Zellen (zusammenstehende Zellen unten) mit klassischen morphologischen Veränderungen der frühen Phase der Apoptose.

Die apoptotischen Zellen sind deutlich kleiner als die vitale Zelle. Dies erklärt sich durch Zelldehydratation und damit verbundener Zellschrumpfung. Außerdem zeigt sich bei den apoptotischen Zellen eine Formveränderung. Der eine Kern ist leicht konkav und das Zytoplasma wirkt schmaler. Die Plasmamembranen von beiden apoptotischen Zellen sind dennoch intakt. Insgesamt scheinen diese Zellen ovaler zu sein.

Ebenfalls fällt bei den apoptotischen Zellen das kondensierte Chromatin im Kern auf. Die DNA darin ist hyperchromatisch (Kernpyknose) und deutlich stärker angefärbt als die der vitalen Zellen.

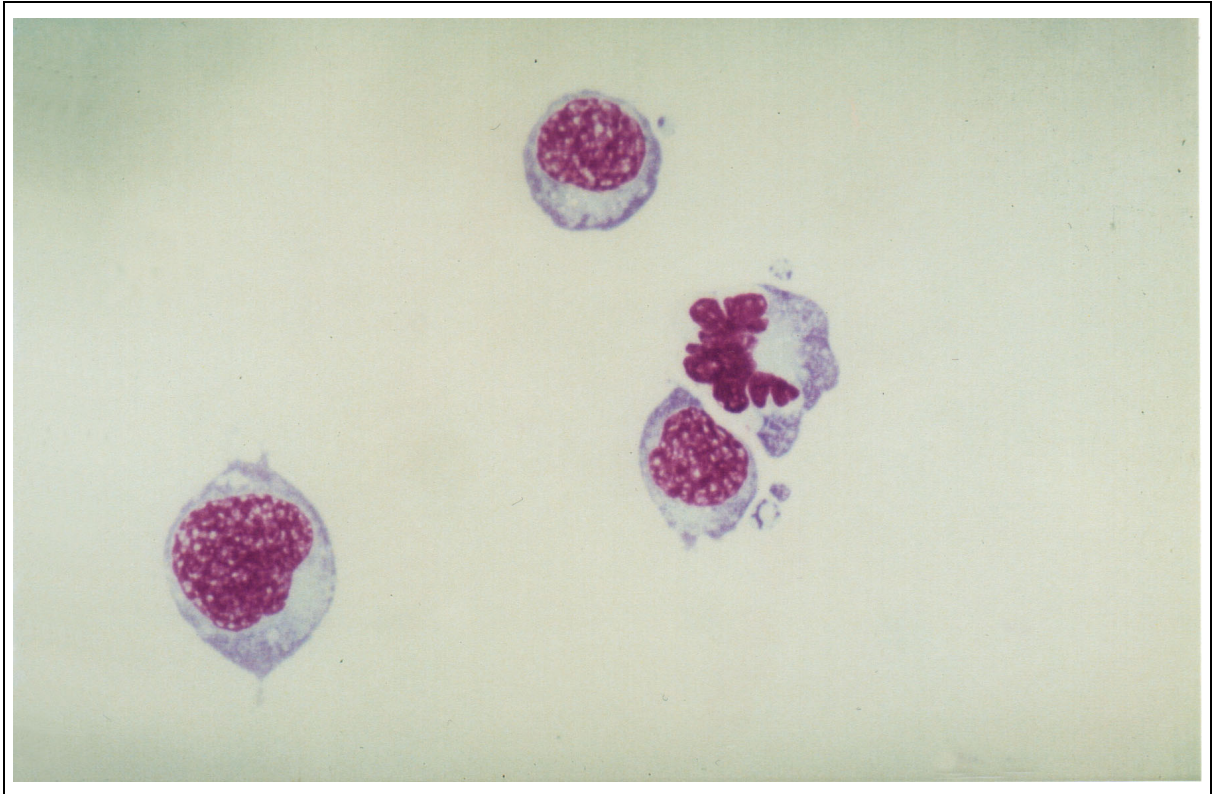


*Abb. 22: Darstellung einer vitalen und zweier apoptotischer Zellen mit charakteristischen Veränderungen der Morphologie wie Zellschrumpfung, Formveränderung Kondensation des Kernchromatins, hyperchromatischer DNA und veränderter Anfärbung der Zellen*



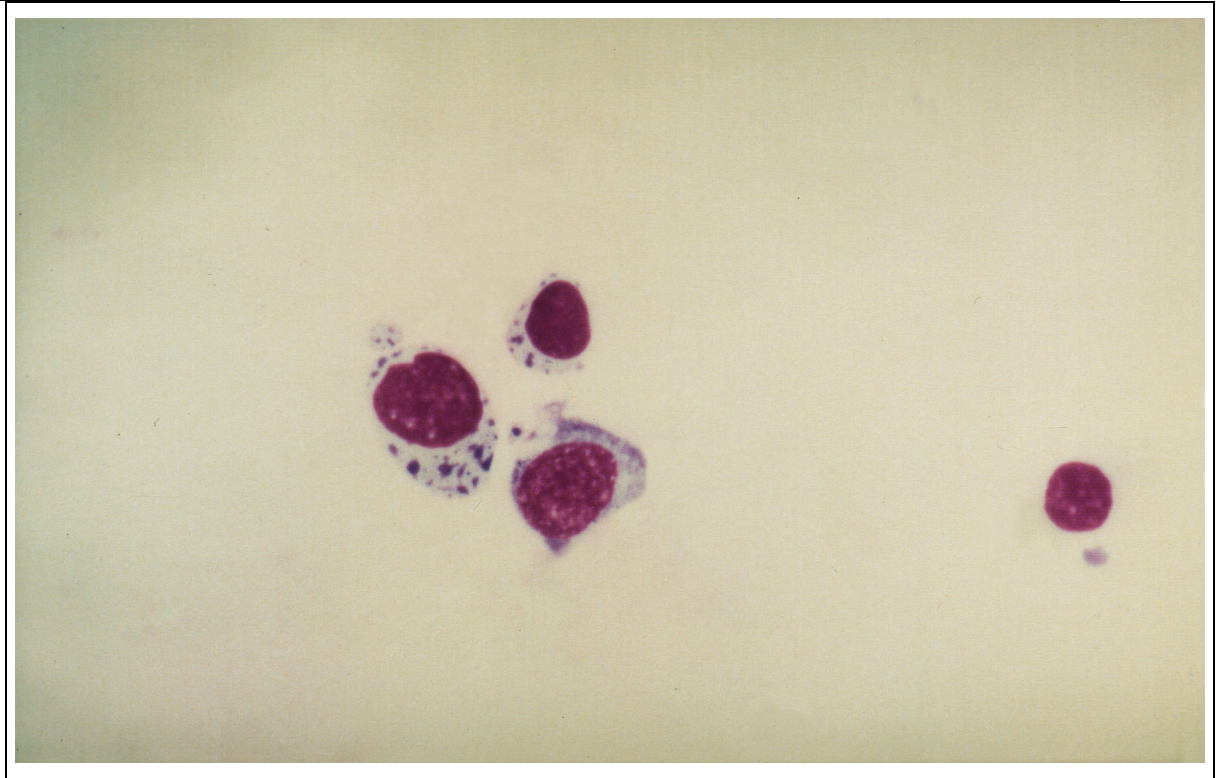
Auf Abb. 23 sind vier Zellen abgebildet, drei vitale Zellen ohne morphologische Veränderungen und eine apoptotische Zelle (rechts außen) mit Veränderungen.

Diese Zelle lässt die Desintegration der Kernstruktur mit Karyorrhexis (Fragmentation des Kerns) erkennen. Dies führt später zur Karyolysis, der Kernauflösung. Wie in Abb. 22 schon erkennbar ist, weist der Kern auch auf diesem Bild trotz Fragmentation eine vermehrte Anfärbung gegenüber den vitalen Zellen auf. Das Zytoplasma und auch die Plasmamembran sind im Vergleich zu den vitalen Zellen ebenfalls stark verändert.



*Abb. 23: Darstellung von drei vitalen Zellen und einer apoptotischen Zelle mit morphologischen Veränderungen, wie Kernfragmentation und Kernauflösung*

Abb. 24 zeigt vier apoptotische Zellen. Die drei zusammenliegenden Zellen weisen wie in Abb. 22 bereits beschriebene Veränderungen auf. Zusätzlich sind einige Kernfragmente im Zytoplasma verteilt, besonders deutlich bei der Zelle links außen. Die Fragmente sind wie der Kern stark angefärbt und befinden sich homogen verteilt. Bei einer Zelle (links außen) löst sich ein „apoptotischer Körper“ am oberen Pol, siehe auch Beschreibung zu Abb. 25.

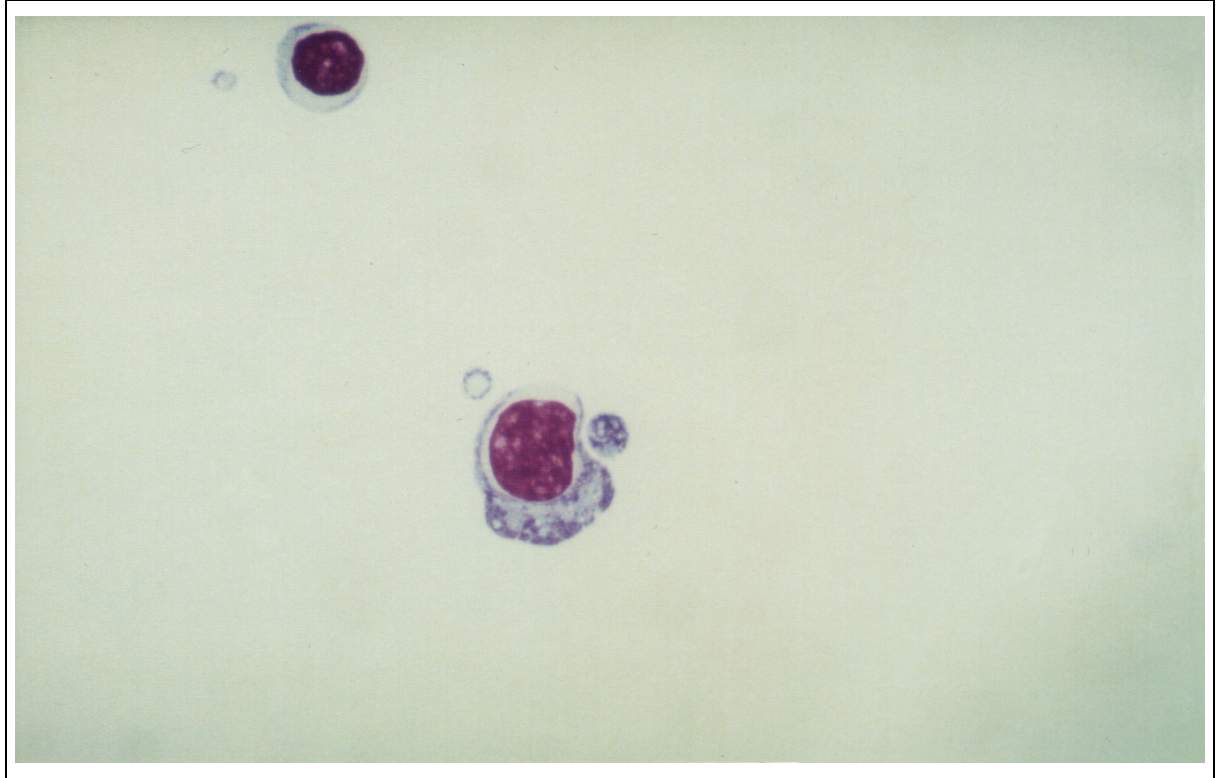


*Abb. 24: Darstellung von vier apoptotischen Zellen mit charakteristischen Veränderungen, wie stark angefärbten Kernfragmenten im Zytoplasma verteilt und Ablösung eines apoptotischen Körpers an der linken Zelle*

In Abb. 25 werden zwei apoptotische Zellen dargestellt. Die obere weist morphologische Veränderungen auf, die schon zu den anderen Abbildungen erklärt worden sind.

Die untere apoptotische Zelle zeigt neben diesen Veränderungen noch die Ablösung von zwei „apoptotischen Körpern“ (apoptotic bodies). Diese beinhalten Kernfragmente und intakte Zellorganellen und werden von Fragmenten der Plasmamembran umhüllt.





*Abb. 25: Darstellung von zwei apoptotischen Zellen mit charakteristischen Veränderungen, wie der Ablösung von „apoptotischen Körpern“ bei der unteren Zelle*

Die Abb. 21–25 zeigen alle charakteristische, morphologische Veränderungen während des Apoptoseprozesses. Diese bildhaften Darstellungen machen deutlich, dass wirklich Apoptose stattgefunden hat und dass die mittels Durchflußzytometrie ermittelten Daten zur Apoptose verwertbar sind.

Es zeigen sich keine Unterschiede in der Morphologie der Apoptose, die durch Daunorubicin oder Daunoxome induziert wird.

#### 4.5 Vergleich der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin und Daunoxome mittels konfokaler Lasermikroskopie

Für die zelluläre Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin ist neben Invasion und Evasion die intrazelluläre Verteilung der Substanzen von großer Bedeutung. Diese lässt sich wegen der starken Fluoreszenz Daunorubicins sehr gut mittels konfokaler Lasermikroskopie bestimmen. Um die Ergebnisse mit denen der Invasion vergleichen zu können, werden ähnliche Zeitpunkte wie bei den Invasionsversuchen ausgewählt. Die Versuche werden nach 3.5 durchgeführt.

Abb. 26 zeigt die intrazelluläre Verteilung von freiem Daunorubicin 5 µg/ml nach 1,5 h Inkubation. Es ist zu einem Einstrom der Substanz gekommen. Dies ist an beiden Zellen deutlich sichtbar. Es ist zu erkennen, dass die Kerne keine Fluoreszenz aufweisen. Sie sind als dunkle Schatten mit typischen Einschnürungen im Zentrum der Zelle zu sehen. Die Fluoreszenz befindet sich im Zytoplasma. Sie ist diffus verteilt mit teilweise lokalisierten Arealen stärkerer Fluoreszenz, die Zellorganellen (Mitochondrien, Golgi-Apparate) entsprechen könnten.

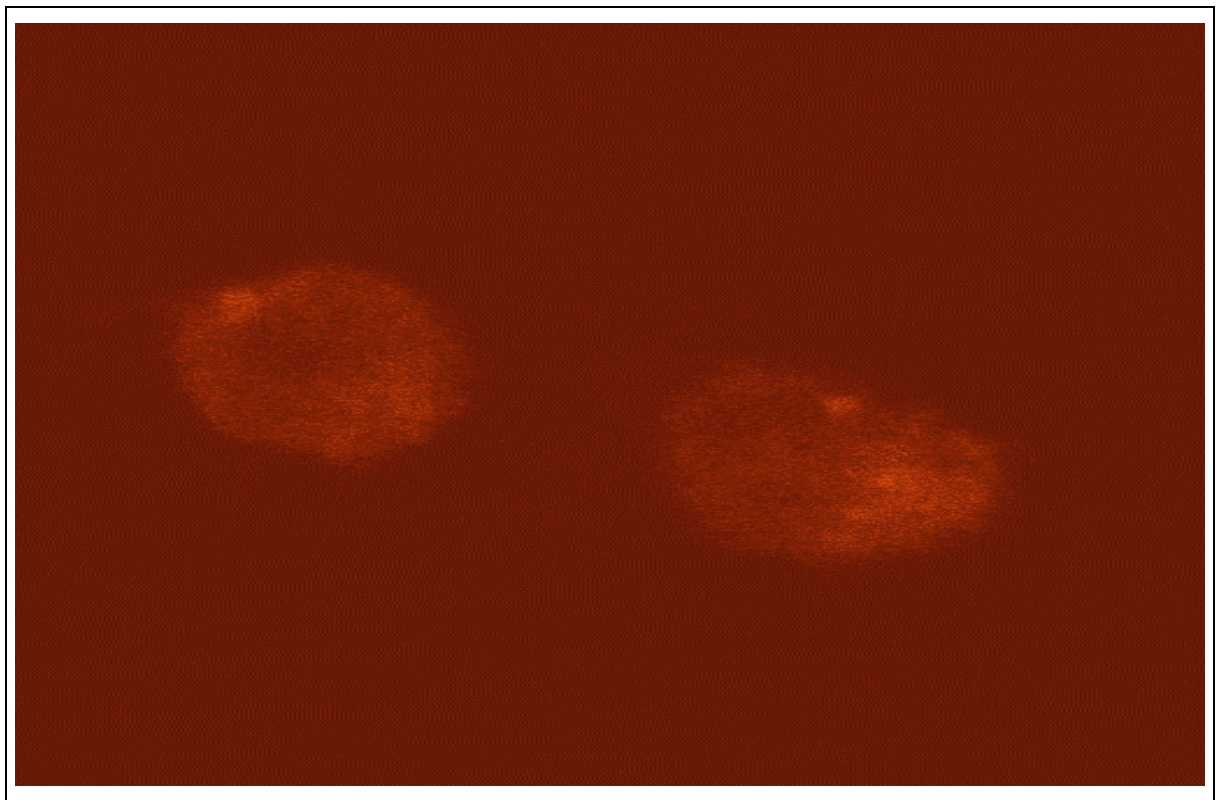
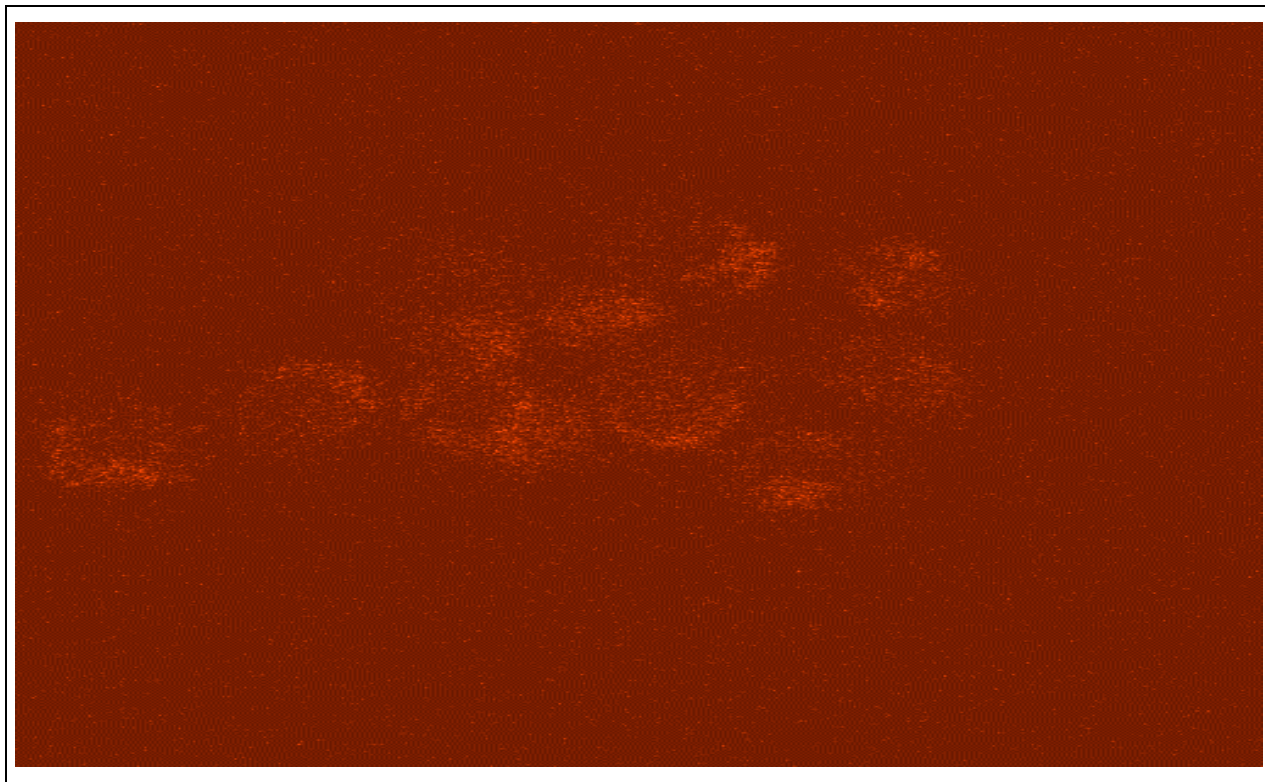


Abb. 26: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin 5 µg/ml nach 1,5 h Inkubation, die Fluoreszenz befindet sich im Zytoplasma, der Kern ist frei

Abb. 27 stellt eine Übersicht von Zellen mit der intrazellulären Verteilung von liposomal verkapseltem Daunorubicin (Daunoxome) 5 µg/ml nach 1,5 h Inkubation dar. Auch hier wird ersichtlich, dass dies zur Invasion der Substanz geführt hat.

Auf der Abbildung ist zu erkennen, dass die mit Daunoxome behandelten Zellen eine deutlich schwächere Fluoreszenz aufweisen im Vergleich zu den mit Daunorubicin behandelten Zellen (Abb. 26). Auch bei diesen Zellen befindet sich die gesamte Fluoreszenz im Zytoplasma. Sie ist nicht diffus-fleckig, sondern homogen verteilt ohne stärker lokalisierte Areale wie bei Daunorubicin nach 1,5 h Inkubation.

Die Kerne sind frei von Fluoreszenz. Sie stellen sich als dunkle Areale, teilweise mit Einschnürungen, umgeben vom fluoreszierendem Zytoplasma dar.



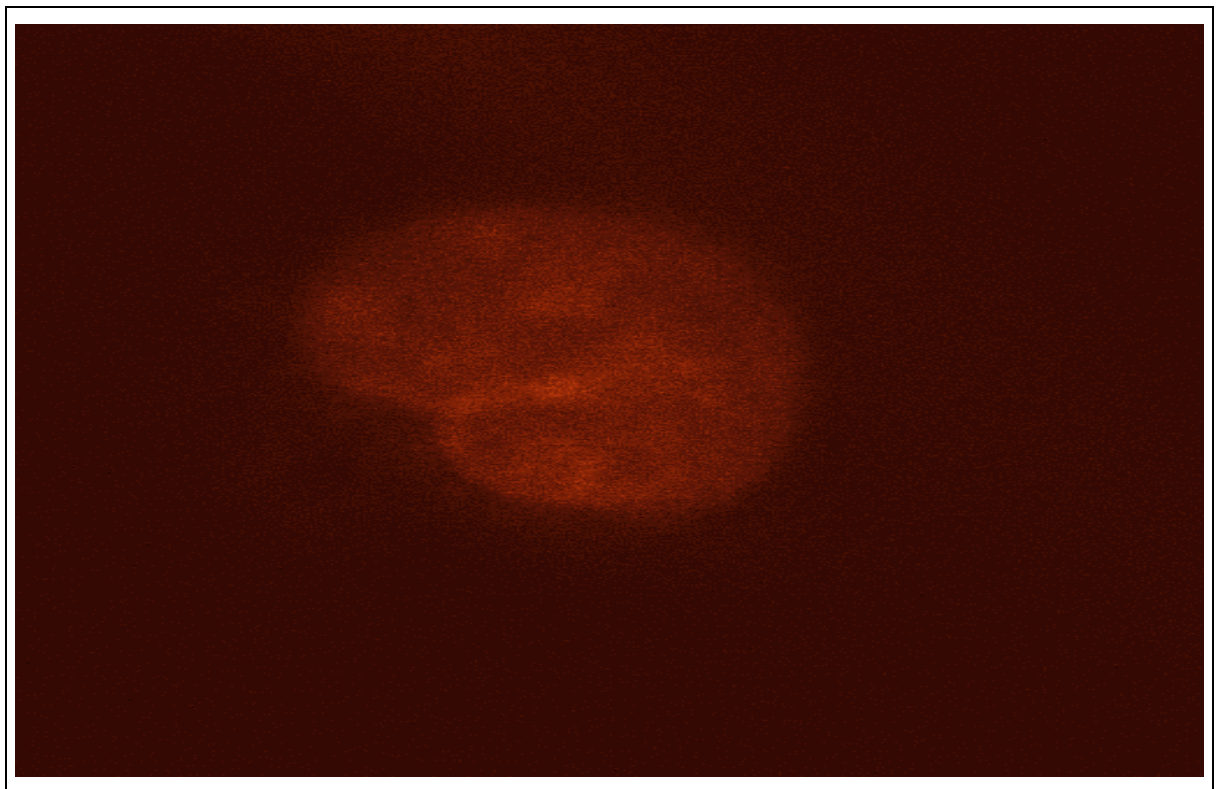
*Abb. 27: Darstellung der intrazellulären Verteilung von liposomal verkapseltem Daunorubicin (Daunoxome) 5 µg/ml nach 1,5 h Inkubation anhand multipler Zellen, bei denen sich die Fluoreszenz im Zytoplasma befindet, die Kerne sind frei*

Abb. 28 zeigt die intrazelluläre Verteilung von Daunorubicin 5 µg/ml nach 3 h Inkubation.

Bei der abgebildeten Zelle stellt sich der Kern mit seiner charakteristischen Einschnürung heller dar. Das Zytoplasma umgibt diesen als schmalen Saum und wirkt dunkler.

Daraus wird deutlich, dass es bei freiem Daunorubicin in dem Zeitraum von 1,5 h-3 h Inkubation zu einer Verschiebung der Fluoreszenz vom Zytoplasma in den Kern gekommen ist.

Die Fluoreszenz ist nur noch zu einem geringen Anteil im Zytoplasma verteilt, der größte Anteil befindet sich im Nukleus. Die Fluoreszenz ist dort sehr intensiv und verteilt sich unregelmäßig mit stärkeren und schwächeren Arealen.

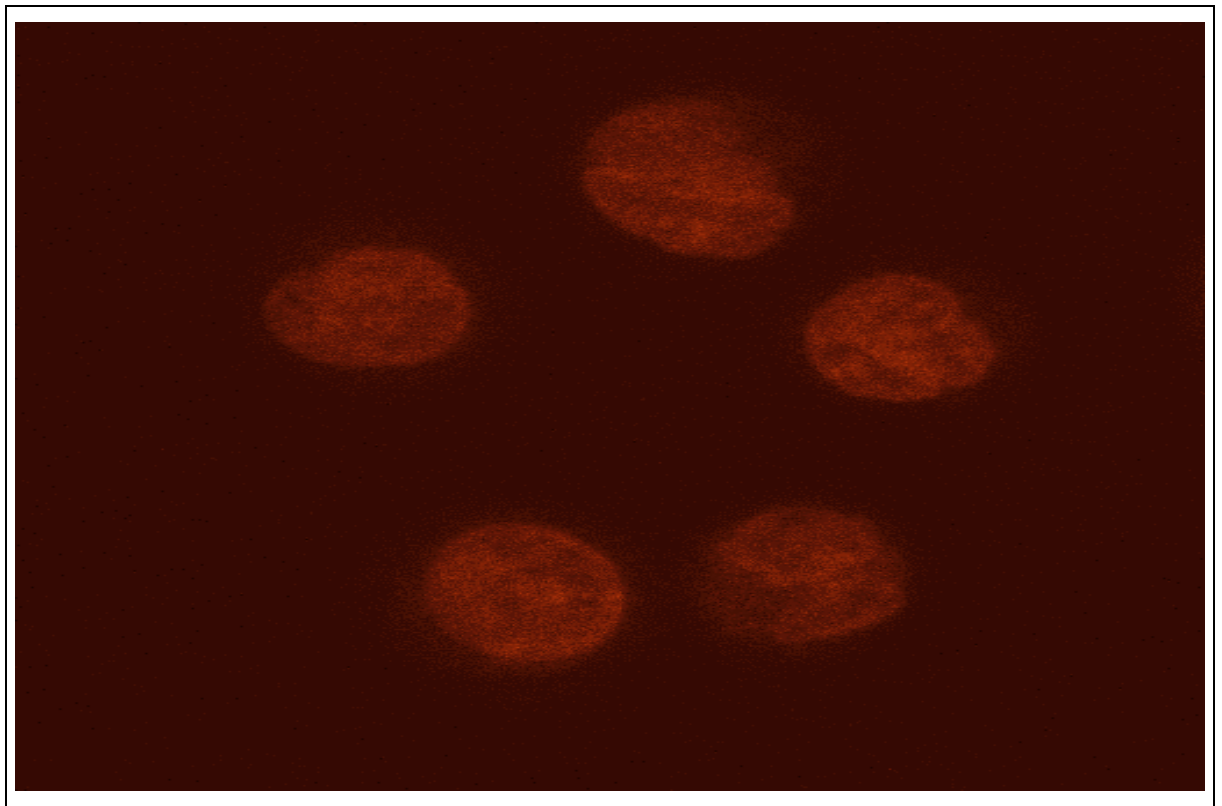


*Abb. 28: Darstellung der intrazellulären Verteilung von freiem Daunorubicin 5 µg/ml nach 3 h Inkubation, die Fluoreszenz verteilt sich unregelmäßig im Kern mit stärkeren und schwächeren Arealen, das Zytoplasma ist fast frei*

Auf Abb. 29 ist die Verteilung von Daunoxome 5µg/ml nach 3 h Inkubation zu betrachten. Es zeigt fünf Zellen im Kreis, mit heller abgebildeten Kernen mit Einschnürungen und dunklen Säume, die das Zytoplasma darstellen.

Es hat wie auch bei Daunorubicin nach 3 h Inkubation eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität vom Zytoplasma in den Kern stattgefunden, wobei das Zytoplasma fast keine Fluoreszenz mehr aufweist, die Kerne dahingegen eine deutliche.

Die Fluoreszenz im Kern ist unregelmäßig verteilt, aber homogener als bei Daunorubicin nach 3 h Inkubation (siehe Abb. 28). Es ist auch zu erkennen, dass nach der entsprechenden Inkubationszeit die Fluoreszenz nicht so intensiv ist wie bei Daunorubicin.



*Abb. 29: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunoxome 5 µg/ml nach 3 h Inkubation, das Zytoplasma ist fast frei, im Kern verteilt sich die Fluoreszenz unregelmäßig*

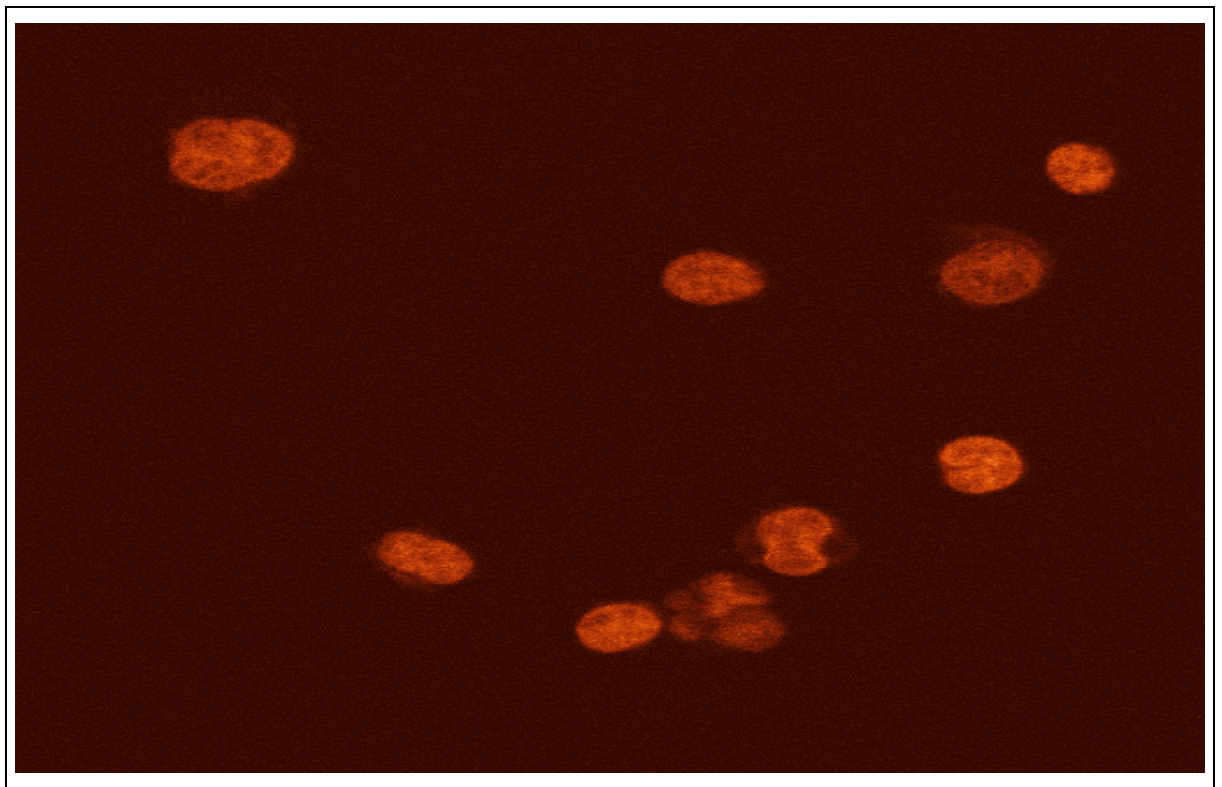


Die Ergebnisse der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin und Daunoxome 5 µg/ml nach 6 h Inkubation werden zusammen besprochen und anhand einer Abbildung verdeutlicht.

Abb. 30 zeigt eine Übersichtsaufnahme der Fluoreszenzverteilung von Daunorubicin nach 6 h. Auch hier sind die Kerne heller dargestellt, das Zytoplasma umgibt diese als dunkle Säume. Es ist erneut zu erkennen, dass das Zytoplasma fast frei von Fluoreszenz ist. Diese verteilt sich unregelmäßig im Kern. Im Vergleich zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin nach 3 h Inkubation ist keine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen.

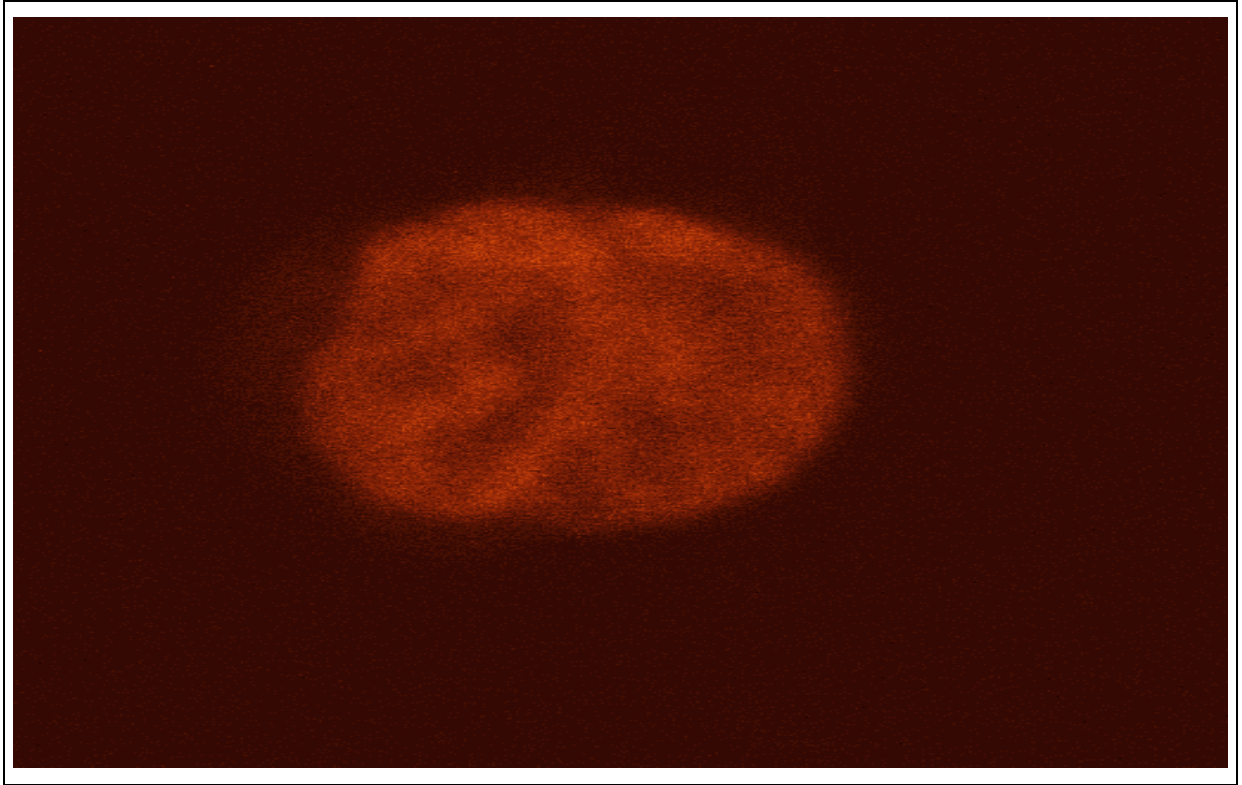
Bei Daunoxome ergibt sich ein ähnliches Bild nach 6 h Inkubation. Es befindet sich keine Fluoreszenz im Zytoplasma, die Verteilung im Kern ist unregelmäßig. Bei Daunoxome führt die längere Inkubationszeit von 6 h (im Gegensatz zu 3 h) zu einer Zunahme der Fluoreszenz im Kern.

Nach 6 h Inkubation ist auch zu erkennen, dass die Fluoreszenz von Daunoxome geringer ist als die von Daunorubicin, hier nicht bildlich dargestellt.



*Abb. 30: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin nach 6 h Inkubation, das Zytoplasma weist keine Fluoreszenz auf, im Kern verteilt sie sich unregelmäßig*

Abb. 31 zeigt die intrazelluläre Verteilung von Daunorubicin nach 24 h und stellvertretend für Daunoxome nach 24 h Inkubation. Es zeigt sich bei der Untersuchung, dass nur ein geringer Anteil der Zellen Vitalität aufweist. Diese Zellen weisen bei beiden Substanzen keine Fluoreszenz im Zytoplasma auf, aber eine sehr starke im Kern. Unterschiede zwischen den beiden Substanzen in der Fluoreszenzintensität existieren nicht mehr.



*Abb. 31: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin nach 24 h Inkubation mit sehr starker Fluoreszenz im Kern und keiner im Zytoplasma*

Die Ergebnisse der Experimente zur Invasionskinetik mittels Durchflußzytometrie und der intrazellulären Verteilung mittels konfokaler Lasermikroskopie zeigen eine Übereinstimmung bezüglich der Zunahme der intrazellulären Konzentration, dargestellt als Fluoreszenzintensität.

Freies Daunorubicin verursacht schon nach 1,5 h Inkubation eine hohe intrazelluläre Fluoreszenz und erreicht nach 3 h ein Plateau. Weder nach 6 h noch nach 24 h sind weitere Änderungen erkennbar.

Bei Zellen, die mit liposomal verkapseltem Daunorubicin behandelt werden, nimmt die Fluoreszenz langsamer zu und erreicht in den ersten 6 h nach Inkubation nicht so hohe Werte wie freies Daunorubicin. Nach 24 h lassen beide Substanzen gleiche Fluoreszenzintensitäten erkennen.

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand einer T-lymphatischen Zelllinie (CEM-Zellen) die zelluläre Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Außerdem wurde die Apoptoseinduktion als Parameter der Pharmakodynamik beider Substanzen untersucht.

In dieser Arbeit wurden deutliche Unterschiede der zellulären Pharmakokinetik und der Apoptoseinduktion von Daunorubicin und Daunoxome nachgewiesen. Damit können Ergebnisse, die in ähnlichen Arbeiten ebenfalls unter in vitro-Bedingungen gewonnen wurden, teilweise bestätigt werden. Die Ergebnisse der vergleichbaren Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Forssen et al. [19] untersuchten in vitro die intrazelluläre Verteilung von Daunorubicin und Daunoxome anhand von P1798 Lymphosarkomzellen mittels Lasermikroskopie. Ebenfalls ermittelten sie die Invasion der beiden Substanzen mittels Durchflußzytometrie.

Bei seinen Versuchen zu der intrazellulären Verteilung zeigte sich, dass Daunorubicin sehr rasch in den Zellen akkumulierte. Bereits nach 1,5 h Inkubation wiesen die Zellen eine intensive Fluoreszenz im Zytoplasma und eine signifikante im Kern auf. Es fanden sich teilweise fokale Areale im Zytoplasma mit intensiverer Fluoreszenz, die wahrscheinlich Zellorganellen entsprachen. Nach 3 h und zu allen weiteren Messzeitpunkten ergab sich ein deutlich homogeneres Bild. Daunoxome wies im Gegensatz dazu nach 1,5 h deutlich weniger Fluoreszenz sowohl im Zytoplasma als auch im Kern auf. Erst nach 7 h kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Fluoreszenz im Kern und im weiteren Verlauf zur Angleichung der Intensität von Daunorubicin.

Die von Forssen et al. ermittelten durchflußzytometrischen Daten entsprachen diesen Ergebnissen zur intrazellulären Verteilung. Auch hier verlief die Invasion von Daunorubicin rasch. Nach einem schnellen Einstrom der Substanz wurde bereits nach kurzer Zeit ein Plateau erreicht. Bei Daunoxome kam es zu einem langsameren Einstrom. Das Plateau wurde deutlich später erreicht. Nach längerer Versuchsdauer kam es aber zur Angleichung der Fluoreszenzwerte. Es ergaben sich zwischen Daunoxome und Daunorubicin keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fluoreszenzintensitäten.

Nagasawa et al. [18,83] untersuchten in zwei Studien in vitro die Invasion und Evasion von Daunorubicin anhand von HL60 Leukämiezellen. Sie wiesen nach, dass die Invasion zeit-, konzentrations- und temperaturabhängig war und einer Sättigungskinetik folgte. Es kam zu einem raschen, fast linearen Einstrom der Substanz und dem Erreichen eines Plateaus nach 15 min Inkubation. Die Evasion zeigte sich ebenfalls zeitabhängig. Sie



verlief biphasisch mit einem kurzem, raschem Ausstrom, gefolgt von einem langsamen, anhaltendem.

Nagasawa et al. [18,83] nahmen an, dass das nicht freiwerdende Daunorubicin in Lysosomen akkumulierte oder im Kern fest gebunden war.

Serafino et al. [84,85] untersuchten in zwei Arbeiten die intrazelluläre Verteilung von Anthrazyklinen mittels konfokaler Lasermikroskopie und zusätzlich die morphologischen Veränderungen während der Apoptose anhand von K562 Leukämie- und Melanomzelllinien. Sie bestätigten die Apoptoseinduktion durch Anthrazykline. Ebenfalls stellten sie einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Akkumulation der Substanzen und der Apoptoseinduktion her.

Dabei induzierten Anthrazykline sowohl nach direkter Interaktion mit Kernstrukturen als auch nach Bindung an zytoplasmatischen Komponenten Apoptose.

Trotz dieser beschriebenen Daten und einer Vielzahl anderer über die Pharmakokinetik von Daunorubicin und Daunoxome liegen bislang noch keine Arbeiten vor, in denen alle Teilaspekte (Invasion, Evasion und intrazelluläre Verteilung) der initialen zellulären Pharmakokinetik und die Apoptoseinduktion als Parameter der Pharmakodynamik der beiden Substanzen ermittelt werden. Ebenfalls ist der direkte Vergleich all dieser Daten des freien und des liposomal verkapselten Daunorubicins noch nie durchgeführt worden. Diese Problemstellungen sind das Thema der vorliegenden Arbeit, deren Ergebnisse sich wie folgt darstellen.

### **5.1 Kurze zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit**

Die Invasion des freien Daunorubicins erfolgt sehr rasch und annähernd linear innerhalb der ersten 120 min nach Inkubation. Es kommt bei allen Konzentrationen zu einem steilen Anstieg der Fluoreszenzen und einer schnellen Anreicherung der Substanz in den Zellen und dem Erreichen eines Plateau nach 180 min. Die Invasionskinetik verläuft gemäß der Kurve einer Sättigungskinetik, also einer negativen e-Funktion mit der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit in den ersten 30 min nach der Inkubation.

Die intrazelluläre Anreicherung des liposomal verkapselten Daunorubicins erfolgt deutlich langsamer und weniger steil als bei freiem Daunorubicin. Die Fluoreszenzintensität gleicht sich aber über die Zeit (nach 360-540 min) an, auch wenn sowohl die Anfangsgeschwindigkeit als auch die maximale Einstromgeschwindigkeit immer niedriger bleiben als bei freiem Daunorubicin. Die Kurve dieser Invasionskinetik beschreibt einen

sigmoiden Verlauf mit einer anfangs langsameren Einstromgeschwindigkeit und Erreichen der maximalen Geschwindigkeit nach 180 min.

Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die Invasion von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin über unterschiedliche Mechanismen ablaufen könnten. Während Daunorubicin mittels passiver Diffusion einströmt, wird Daunoxome durch Endozytose aufgenommen, wodurch die Vorgänge verlangsamt werden [12, 15, 39].

Bei beiden Substanzen sind die Invasionsvorgänge konzentrations- und zeitabhängig. Dies besagt, dass die Invasionsgeschwindigkeit mit der extrazellulären Konzentration korreliert und sich im Laufe der Inkubationszeit verändert. Je höher die extrazellulären Konzentration ist, desto schneller strömt die Substanz ein und desto höher sind die maximal erreichten Fluoreszenzintensitäten.

Die mittels konfokaler Lasermikroskopie ermittelten Daten zur intrazellulären Verteilung der beiden Substanzen unterstützen diese Ergebnisse zur Invasionskinetik. Freies Daunorubicin strömt schnell in die Zellen ein, befindet sich nach 1,5 h Inkubation zunächst im Zytoplasma, wo es diffus-fleckig verteilt vorliegt mit teilweise stärker fluoreszierenden Arealen. Nach 3 h verteilt sich dann die Fluoreszenz in den Kern. Dort verbleibt sie und nimmt über den gemessenen Zeitraum weiter an Intensität zu.

Das Verhalten des liposomal verkapselten Daunorubicins ähnelt bezüglich der Verteilung dem freien Daunorubicin. Nach 1,5 h Inkubation hält sich die Substanz im Zytoplasma auf. Hier ist sie deutlich homogener verteilt als das freie Daunorubicin nach 1,5 h. Nach 3 h ist die Fluoreszenz im Kern nachweisbar, stellt sich aber im Gegensatz zu Daunorubicin deutlich weniger ausgeprägt dar. Nach 6 h Inkubation befinden sich beide Substanzen im Nukleus. Während bei freiem Daunorubicin die längere Inkubation nicht zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität führt, ist bei Daunoxome eine deutliche Zunahme sichtbar. Auch nach 6 h ist die Intensität im Verhältnis zu freiem Daunorubicin noch schwächer. Nach 24 h Inkubation ist kein Unterschied zwischen den Fluoreszenzintensitäten von Daunorubicin und Daunoxome mehr nachweisbar.

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität verläuft bei Daunoxome wie auch die Invasion deutlich langsamer als bei freiem Daunorubicin. Über einen längeren Zeitraum erreicht Daunoxome aber ebenso hohe Fluoreszenzintensitäten wie Daunorubicin.

Es zeigt sich außerdem, dass die rasche Invasion des Daunorubicins schnell zur Apoptoseinduktion führt. Nach kurzer Inkubationszeit induziert Daunorubicin in höheren extrazellulären Konzentrationen (Daunorubicin 10 µg/ml und auch Daunorubicin 5 µg/ml) Apoptose, in niedrigeren Konzentrationen allerdings weniger.

Über einen längeren Zeitraum (nach 360 min) gleichen sich alle Apoptoseraten der unterschiedlichen Konzentrationen einander an und weisen nach 480 min Inkubation kaum noch Unterschiede auf.

Im Gegensatz zu Daunorubicin erfolgt die Apoptoseinduktion bei Daunoxome deutlich verzögert. Aber auch hier ist erkennbar, dass höhere extrazelluläre Konzentrationen von Daunoxome (Daunoxome 10 µg/ml und 5 µg/ml) anfangs deutlich vermehrt zur Apoptoseinduktion führen als niedrige Konzentrationen. Über die Zeit erfolgt ebenfalls eine Zunahme aller Apoptoseraten. Es kommt nach einer fortdauernden Inkubation (nach 480 min) zu einer Angleichung der Apoptoseraten bei allen drei Daunoxomekonzentrationen. Ebenfalls bestehen nur noch geringe Unterschiede zu den Werten von Daunorubicin nach 480 min Inkubation.

Bei beiden Substanzen korreliert die Geschwindigkeit der Apoptoseinduktion mit der extrazellulären Konzentration. Je höher diese gewählt wird, desto schneller resultiert die Apoptoseinduktion.

Die entstehenden morphologischen Veränderungen, verursacht durch freies und liposomal verkapseltes Daunorubicin während der Apoptose, lassen sich lichtmikroskopisch nachweisen. Diese gestalten sich unabhängig von Substanz, Konzentration und Inkubationszeit immer gleich.

Wie bei der Invasion, der intrazellulären Verteilung und der Apoptoseinduktion deutlich wird, kommt es bei Daunoxome im Vergleich zu Daunorubicin initial zu verzögerten pharmakodynamischen Effekten. Die langsamere Invasion führt zu einer deutlich verzögerten Apoptoseinduktion. Eine längere Exposition (bei dieser Arbeit mindestens 360 bis 540 min) mit Daunoxome führt dann aber zu einer Angleichung der maximal erreichten intrazellulären Konzentrationen und der Apoptoseraten des liposomalen Daunorubicins an die des freien Daunorubicins.

Die Evasion der beiden Substanzen unterscheidet sich grundlegend voneinander. Bei freiem Daunorubicin verläuft sie biphasisch. Es kommt innerhalb der ersten 60 min nach Inkubation zu einem schnellen Ausstrom, gefolgt von einem sehr langsamen über die restliche Versuchszeit. Dies trifft für die hohen extrazellulären Konzentrationen zu. Die niedrige Konzentration verhält sich eher wie das liposomale Daunorubicin. Dies weist darauf hin, dass auch die Evasion konzentrations- und zeitabhängig ist.

Liposomal verkapseltes Daunorubicin weist eine monophasische Evasion auf. Es strömt über die gesamte Versuchszeit sehr wenig bis gar kein Daunoxome aus den Zellen aus. Dies trifft für alle Konzentrationen zu. Hier ergibt sich weder eine Konzentrations- noch eine Zeitabhängigkeit.

Es kann vermutet werden, dass sich freies Daunorubicin in zwei unterschiedlichen Kompartimenten verteilt (2-Kompartiment-System) und auch aus zwei Kompartimenten ausströmt. Nur das noch nicht gebundene (Zytosol) Daunorubicin kann die Zellen noch verlassen, das gebundene (Kern oder Zellorganellen, intrazelluläre Subkompartimente) dahingegen nicht (siehe auch Abb. 32).

Im Gegensatz dazu scheint sich DaunoXome in einem 1-Kompartiment-System zu verteilen. Offenbar strömt liposomal verkapseltes Daunorubicin zwar langsamer in die Zellen ein, wird dann aber fester gebunden (Zellmembran, Zellorganellen, Kern) oder liegt noch verpackt in Liposomen vor, die den Efflux verhindern. Somit strömt DaunoXome sehr langsam oder gar nicht aus den Zellen aus.

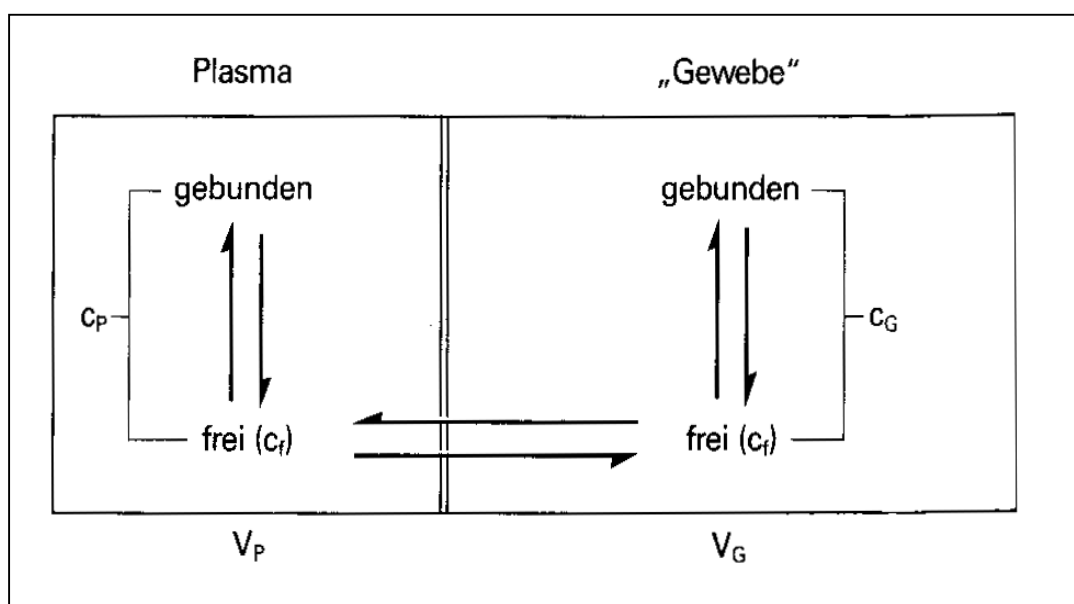


Abb. 32: Schematische Darstellung zweier Kompartimente mit der Verteilung von gebundenen und freien Substanzkonzentrationen [aus Forth, [3]], dieses Modell stellt die Verteilung von freiem Daunorubicin dar

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse zur Invasionskinetik

Wie aber verhalten sich diese Ergebnisse zu denen anderer Autoren? Wo bestehen Übereinstimmungen und wo Widersprüche? Wie lassen sich diese erklären?

Wie oben bereits beschrieben, untersuchten Nagasawa et al. [18,83] in zwei Studien die Invasion von Daunorubicin anhand von Leukämiezellen. Wie in der vorliegenden Arbeit folgte diese einer Sättigungskinetik mit einem anfangs raschen Einstrom. Die dabei ermittelten Zeiten der Gleichgewichtseinstellung lagen allerdings deutlich unter denen, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden. Während bei Nagasawa et al. [18,83] nach 15 min ein Plateau erreicht wurde, dauerte dies in der vorliegenden Arbeit 180 min. Dies

lässt sich möglicherweise durch die Wahl unterschiedlicher Zellen (HL60 versus CEM-Zellen) und deren unterschiedliches Verhalten erklären. Ebenfalls könnte die Wahl der unterschiedlichen Methodik (Durchflußzytometer versus High Performance Liquid Chromatography) eine Rolle spielen.

Sowohl Nagasawa et al. [18,83] als auch diese Arbeit wiesen eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit nach. Dies bestätigte sich durch die Ermittlung der maximalen Einstromgeschwindigkeit. In beiden Arbeiten zeigte sich eine annähernd lineare Beziehung zwischen der extrazellulären Konzentration Daunorubicins und des initialen Einstroms, je höher diese Konzentration, desto höher die maximale Einstromgeschwindigkeit (siehe auch Abb. 33, Daten dieser Arbeit).

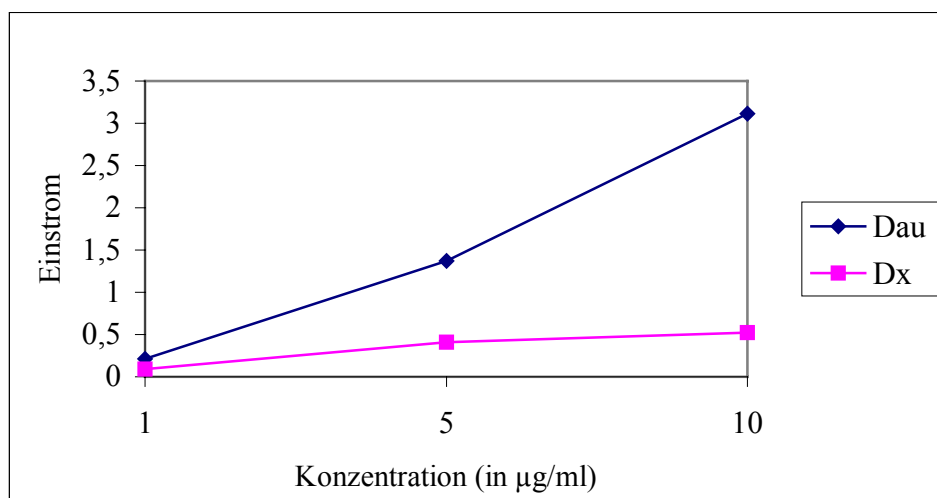


Abb. 33: Kurvenverlauf der maximalen Einstromgeschwindigkeit von Daunorubicin und Daunoxome in drei Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml)

Anhand dieser Graphik wird deutlich, dass auch bei Daunoxome ein linearer Zusammenhang zwischen der extrazellulären Konzentration und der Einstromgeschwindigkeit besteht. Es werden allerdings in keiner Konzentration die maximalen Einstromgeschwindigkeiten von Daunorubicin erreicht. Ebenfalls wird ersichtlich, dass freies und liposomal verkapseltes Daunorubicin unterschiedliche Steigungen und damit verschiedene Invasionskonstanten aufweisen, wobei Daunoxome eine niedrigere Invasionskonstante als Daunorubicin besitzt.

Leider führten Nagasawa et al. [18,83] keine Untersuchungen durch, um die Invasion und die Einstromgeschwindigkeit von Daunorubicin und Daunoxome direkt miteinander zu vergleichen.

McGown et al. [72] untersuchten ebenfalls die Invasion von Daunorubicin. Sie ermittelten die intrazelluläre Akkumulation von Daunorubicin mittels Durchflußzytometrie anhand von P388-Leukämiezellen und Fluorometrie nach Substanzextraktion. Übereinstimmend mit

den anderen Arbeiten zeigte sich, dass der initiale Einstrom von Daunorubicin sehr rasch verläuft und nach

1-2 Stunden komplett war. Auch hier wurde das Plateau früher erreicht als in dieser Arbeit aber doch deutlich später als bei Nagasawa et al. [18,83], was sich erneut durch die unterschiedlichen Zelllinien und die unterschiedliche Methodik erklären lassen könnte. Wie auch in der vorliegenden Arbeit nach 540 min kam es bei McGown et al. [72] nach längerer Versuchsdauer zu einem Abfall der Fluoreszenzintensitäten im Kurvenverlauf (siehe Abb. 12). Dieser wurde durch Zellruption erklärt, die durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt wurde. Es kam jedoch im Gegensatz zu dieser Arbeit zu keiner genauen Spezifizierung, ob es sich um apoptotische oder nekrotische Zellen handelte.

Anders die bereits beschriebene Arbeit von Forssen et al. [19], welche den direkten Vergleich der Invasion von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin anhand von Lymphosarkomzellen zum Gegenstand hatte. Daunorubicin strömte sehr schnell in die Zellen ein und erreichte nach 7 h das Plateau. Dies ähnelt den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Das Erreichen des Plateaus dauert zwar länger, doch handelt es sich auch um eine solide Tumorzelllinie und nicht um eine hämatologische. Aus diesem Grund können insgesamt die Versuchszeiten länger gewählt werden, da die Lymphosarkomzellen nicht so stark zu Apoptose neigen wie die in dieser Arbeit verwendeten CEM-Zellen. Forssen et al. [19] beobachteten, dass Daunoxome deutlich langsamer in den Zellen akkumulierte und erst nach 20 h das Plateau erreichte. Nach 14-20 h konnten dann keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten von Daunorubicin und Daunoxome festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die der vorliegenden Arbeit, in der Daunoxome anfangs ebenfalls deutlich langsamer akkumuliert, über eine längere Versuchsdauer aber ähnlich hohe Fluoreszenzintensitäten erreicht wie Daunorubicin. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnten Forssen et al. [19] aber nicht nur eine Angleichung der Invasionskinetik der beiden Substanzen nachweisen, sondern eine verbesserte Kinetik von Daunoxome nach ausreichend langer Versuchszeit.

Forssen et al. [19] leiteten aus ihren Beobachtungen die Schlussfolgerung ab, dass freies Daunorubicin nach kurzer Inkubation durch einen schnelleren Invasionsmechanismus zytotoxischer wirkte als liposomal verkapseltes. Nach einer Inkubation von 48 h sei dann aber Daunoxome deutlich potenter als Daunorubicin.

Ähnlich sind auch die Ergebnisse von Sargent et al. [42] zu werten. Hier wurden K562-Leukämiezellen über einen Zeitraum von 96 h mit Daunorubicin oder Daunoxome inkubiert. Sie zeigten, dass nach 1 h Inkubation freies Daunorubicin die Zellen deutlich mehr invadiert hatte und höhere zytotoxische Effekte als liposomal verkapseltes

Daunorubicin aufwies. Nach 7 h kam es zu einer Umkehr, Daunoxome war deutlich zytotoxischer und dies nahm über die weitere Versuchszeit noch zu.

Im Gegensatz dazu fanden Pratt et al. [49] heraus, dass freies Daunorubicin die Zellproliferation mehr inhibierte als liposomal verkapseltes. Auch nach einer Inkubationszeit von 24-42 h kam es zu keiner Umkehrung dieser Effekte. Dies erklärten sie mit der liposomalen Verkapselung, wodurch die Freisetzung der Wirksubstanz Daunorubicin verlängert werden sollte. Sie untersuchten die Wirkung von Daunorubicin und Daunoxome anhand von vier Zelllinien, zwei Myelom-, eine Glioblastom- und eine Lymphomzelllinie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen in sofern mit den anderen Ergebnissen überein, dass initial die Invasion von freiem Daunorubicin deutlich schneller abläuft als die des liposomal verkapselten und es von daher zu Anfang eine höhere Zytotoxizität aufweist. Ebenfalls wird die maximale intrazelluläre Konzentration früher erreicht. Daunoxome weist eine deutlich langsamere Invasionsgeschwindigkeit auf und akkumuliert deshalb verzögert. In dem gewählten Messzeitraum kommt es zwar zu einer Angleichung der Fluoreszenzintensitäten und damit der intrazellulären Konzentration von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin, Daunoxome erreicht aber kein Plateau. Da aber Daunoxome im Gegensatz zu Daunorubicin ein besseres plasmapharmakokinetisches Profil aufweist [19,44,45,47,86] mit verlängerter Halbwertszeit und erniedrigter Totalkörperclearance und deutlich weniger Nebenwirkungen als Daunorubicin [41,49,87] scheint Daunoxome trotz anderer zellulärer Pharmakokinetik mindestens genauso wirksam zu sein wie Daunorubicin.

An dieser Stelle soll auch die unterschiedliche Verlaufsform der Invasionskinetik von Daunorubicin und Daunoxome besprochen werden. Wie oben bereits erwähnt, folgt Daunorubicin einer Sättigungskinetik (negative e-Funktion) während Daunoxome einen sigmoiden Invasionsverlauf aufweist. Für diese sigmoide Form scheinen mehrere Erklärungen in Frage zu kommen. Zuerst könnte es sich um einen Quencheffekt handeln, dieser wird unter 5.5 näher erläutert. Ebenfalls könnte es sich um einen 2-Phasen Prozess handeln, wobei in einer ersten Phase Daunoxome locker an die Zellmembran gebunden vorliegt. Durch das Waschen der Proben vor den einzelnen Messungen, werden diese von der Zellmembran entfernt und dadurch können kaum Fluoreszenzen registriert werden. Nach längerer Exposition kommt es in einer zweiten Phase dann zum Einstrom der Substanz in die Zellen, und zum raschen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung mittels konfokaler Lasermikroskopie unterstützen die Aussagen zur Invasionskinetik, die anhand von der Durchflußzytometrie ermittelt wurden. Freies Daunorubicin strömt schnell in die Zellen ein und verteilt sich

nach 3 h Inkubation vom Zytoplasma in den Kern um. Die Fluoreszenz ist schon nach dieser Inkubationszeit sehr intensiv und nimmt über die restliche Versuchszeit nur noch gering zu. Liposomal verkapseltes Daunorubicin verteilt sich ebenfalls nach 3 h Inkubation vom Zytoplasma in den Kern um, nimmt aber nach weiterer Inkubation noch an Intensität zu. Nach 24 h bestehen zwischen den beiden Substanzen keine Unterschiede mehr in den Fluoreszenzintensitäten.

Auch die Arbeiten von Forssen et al. [19] belegten, dass freies Daunorubicin zu Anfang eine höhere Fluoreszenzintensität aufwies als liposomal verkapseltes. Eine anhaltende Inkubation führte dann im weiteren Verlauf zu einer Angleichung der Intensitäten von Daunoxome an Daunorubicin. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit ermittelten Forssen et al. [19], dass die Umverteilung von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin vom Zytoplasma in den Kern bereits nach 1,5 h Inkubation nachzuweisen war. Grund dafür könnte ebenfalls die Wahl der unterschiedlichen Zelllinien darstellen. Dafür könnten auch Ergebnisse einer Arbeit von

Lautier et al. [88] sprechen. Sie untersuchten die intrazelluläre Verteilung von Daunorubicin anhand unterschiedlicher hämatologischer Zelllinien. Sie fanden heraus, dass einige Zelllinien nach 1 h Inkubation mit Daunorubicin ein Fluoreszenzmuster aufwiesen, bei dem die Substanz hauptsächlich im Kern und diffus im Zytoplasma verteilt war. Bei anderen Zelllinien mit den selben Voraussetzungen zeigte sich nur wenig Fluoreszenz im Kern und im Zytoplasma, dafür vermehrt perinukleär. Dies zeigt das unterschiedliche Verhalten verschiedener Zelllinien an trotz gleicher Ausgangsbedingungen.

Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, dass die intrazelluläre Akkumulation von freiem Daunorubicin schneller verläuft als die des liposomal verkapselten. Eine längere Versuchsdauer und damit eine längere Expositionszeit mit Daunoxome führt dann aber zu einer Angleichung der intrazellulären Konzentration (Fluoreszenzintensität).



### 5.3 Diskussion der Ergebnisse zur Apoptoseinduktion

Ein anderer interessanter Aspekt ist der Zusammenhang zwischen Invasion, intrazellulärer Akkumulation, und der Apoptoseinduktion von Daunorubicin und Daunoxome. Es ist bekannt, dass Anthrazykline durch DNA-Interkalation und Hemmung der Topoisomerase II Apoptose induzieren. Dies stellt einen wichtigen Wirkmechanismus von Anthrazyklinen dar [12]. Es stellt sich allerdings die Frage, inwieweit dies mit der intrazellulären Akkumulation korreliert.

Wie bereits beschrieben, wurde dieser Zusammenhang von Serafino et al. [84,85] in zwei Arbeiten untersucht. Sie bestätigten mittels konfokaler Lasermikroskopie und Durchflußzytometrie, dass Anthrazykline Apoptose induzieren. Sie fanden heraus, dass dies sowohl bei Bindung an Kern- wie auch an Zytoplasmastrukturen auftreten kann.

Auch in dieser Arbeit kann ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Invasion, der intrazellulären Akkumulation und der Apoptoseinduktion beobachtet werden. Daunorubicin strömt sehr schnell in die Zellen ein und ist nach 1,5 h im Zytoplasma und nach 3 h im Kern nachweisbar. Ebenfalls ist die Apoptose schon nach 2 h mittels Durchflußzytometrie und Lichtmikroskopie deutlich zu erkennen. Diese nimmt, wie auch die intrazelluläre Akkumulation von Daunorubicin, während des weiteren Verlaufs noch zu. Im Gegensatz dazu strömt Daunoxome langsamer in die Zellen ein. Auch die intrazelluläre Akkumulation verläuft nicht so rasch. Es kommt zu einer allmählichen Zunahme der Fluoreszenzintensität. Auch induziert Daunoxome zunächst weniger Apoptose als Daunorubicin. Eine längere Expositionszeit führt allerdings sowohl zu einer Zunahme der intrazellulären Akkumulation als auch zu einer Zunahme der Apoptoseraten. Nach 480 min bestehen kaum noch Unterschiede in der Apoptoseinduktion von Daunorubicin und Daunoxome.

Sowohl freies als auch liposomal verkapseltes Daunorubicin induzieren bereits nach 2 Stunden Exposition Apoptose. Zu diesem Zeitpunkt können beide Substanzen nur im Zytoplasma und nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen könnte wie auch bei Sargent et al. [42] geschlossen werden, dass neben der Bindung von Daunorubicin und Daunoxome an Kernstrukturen auch die Bindung an Zytoplasmaanteile für die Apoptoseinduktion verantwortlich sein könnte.

Die Ergebnisse von Gieseler et al. [56,57] und Chiodini et al. [89] bestätigen diese Annahmen. Gieseler et al. [56,57] untersuchten den Zusammenhang zwischen intrazellulärer Verteilung, DNA-Interkalation und Apoptoseinduktion von Daunorubicin anhand von HL-60 Leukämiezellen. Sie beobachteten die intrazelluläre Akkumulation von Daunorubicin und DNA-Doppelstrangbrüche nach 0-1,5 h und Chromatinkondensation

nach 1,5-3 h. Sie wiesen eine lineare Korrelation zwischen Invasion der Substanz (DNA-Bindung) und Apoptoseinduktion nach. Dabei befanden sie die DNA-Bindung als wichtigste Voraussetzung für die Apoptoseentstehung.

Chiodini et al. [89] hatten Untersuchungen über Invasion und Apoptoseinduktion von Daunorubicin zur Grundlage. Auch sie zogen aus ihren Beobachtungen die Schlussfolgerung, dass die Anzahl der apoptotischen Zellen mit der Substanzinvasion- bzw. Akkumulation korrelierte.

Werden alle Ergebnisse miteinander verglichen, bestehen viele Übereinstimmungen. Leider liegen außer bei dieser Arbeit keine anderen Ergebnisse zum direkten Vergleich von Invasion, intrazellulärer Verteilung und Apoptoseinduktion für Daunorubicin und Daunoxome vor.

Ein anderer Ansatzpunkt, der die Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von der extrazellulären Konzentration der Substanzen darstellt, ist ebenfalls von Bedeutung.

Vial et al. [55] bestimmten mittels Durchflußzytometrie die Apoptoseinduktion bei U937 Leukämiezellen nach Behandlung mit Daunorubicin in verschiedenen extrazellulären Konzentrationen. Sie fanden heraus, dass Daunorubicin Apoptose induziert. Besonders effizient war diese bei Behandlung mit hohen Anthrazyklinkonzentrationen über eine kurze Inkubationszeit (in der Studie 1 h). Dies bedeutet, je höher die extrazelluläre Konzentration gewählt wurde, desto schneller führte dies zu vermehrter Apoptoseinduktion.

Die Ergebnisse werden durch diese Arbeit bestätigt. Es zeigt sich anfangs eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit. Die hohen Konzentrationen Daunorubicins induzieren im Gegensatz zu den niedrigen Konzentrationen in den ersten Stunden nach Inkubation vermehrt Apoptose. Eine längere Exposition mit Daunorubicin führt allerdings zu einer Angleichung der Apoptoseinduktion durch alle Konzentrationen.

Auch bei Daunoxome zeigt sich dies. Die hohen extrazellulären Konzentrationen bewirken anfangs vermehrt Apoptoseinduktion im Vergleich zu den niedrigeren. Eine längere Inkubationszeit führt ebenfalls zur Angleichung aller Apoptoseraten der unterschiedlichen extrazellulären Konzentrationen.

Das Fazit aus allen Ergebnissen lautet demnach, dass die frühe Pharmakokinetik von freiem Daunorubicin gegenüber der des liposomal verkapselten Vorteile aufweist. Es strömt sehr schnell in die Zellen ein und liegt intrazellulär bereits nach kurzer Inkubationszeit gehäuft im Kern vor. Dadurch wird auch sehr rasch Apoptose induziert, besonders durch die höheren extrazellulären Konzentrationen.

Das liposomal verkapselte Daunorubicin strömt langsamer in die Zellen, akkumuliert intrazellulär verzögert und führt aus diesem Grund zu einer verzögerten Apoptoseinduktion. Diese Unterschiede werden allerdings nach längerer Exposition mit der Substanz aufgehoben, Daunoxome erreicht verspätet dieselben pharmakokinetischen Effekte wie Daunorubicin und weist dadurch keine Nachteile mehr auf.

Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeit der Apoptoseinduktion von Daunorubicin und Daunoxome unterschiedlich ist, die Apoptoseraten aber nach längerer Exposition gleich sind.

#### **5.4 Diskussion der Ergebnisse zur Evasionskinetik**

Wie oben bereits erläutert, ermittelten sowohl Nagasawa et al. [18,83] und auch Robert et al. [12] für freies Daunorubicin eine biphasische Evasion mit einem schnellen Ausstrom, gefolgt von einem länger anhaltenden langsamen. Sie beschrieben, dass sich Daunorubicin mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten auf zwei Kompartimente verteilt (offenes 2-Kompartiment-System). Die Elimination aus diesen unterschiedlichen Kompartimenten gehorcht einer Kinetik 1.Ordnung.

Diese Daten unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls eine biphasische Evasion ermittelt wurde. Auch hier folgt einem schnellen anfänglichen ein langsamer Ausstrom über die restliche Versuchszeit. Siehe hierzu auch 5.1 und zur bildlichen Darstellung Abb. 32.

Die Evasionskinetik für Daunoxome ist nicht so zu interpretieren, und es kann nur relativ wenig ausgesagt werden. Die sehr langsame Evasion deutet auf eine feste intrazelluläre Bindung hin, mehr locker gebundenes Daunoxome scheint offenbar nicht zu bestehen. Dies lässt im Gegensatz zu freiem Daunorubicin ein 1-Kompartiment-Modell vermuten.

Diese Evasionskinetik könnte ebenfalls darauf hinweisen, dass liposomal verkapseltes Daunorubicin besser in den Zellen festgehalten werden könnte als freies Daunorubicin.

Leider liegen zur Zeit neben Daten der vorliegenden Arbeit keine anderen Daten zur zellulären Pharmakokinetik von Daunoxome vor. Daneben gibt es nur Daten zur Evasion der Plasmapharmakokinetik.

## 5.5 Diskussion methodischer Probleme

Außer diesen Ergebnissen sind ebenfalls methodische Probleme von Interesse, die die Messungen der Konzentrationen von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin beeinflussen könnten. Ebenfalls interessiert, mit welchen anderen Methoden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verifiziert oder sogar erweitert werden könnten.

Zuerst soll bedacht werden, dass die liposomale Verkapselung von Daunorubicin zu Quencheffekten führen könnte. Dies würde bedeuten, dass zu niedrige Fluoreszenzen im Verhältnis zur tatsächlich vorhandenen Gesamtkonzentration des Daunorubicins erfasst werden. Es könnten nur das freie und das DNA-gebundene Daunorubicin richtig gemessen werden, das noch liposomal verkapselte dahingegen nicht.

Der Quencheffekt könnte eine mögliche Erklärung des sigmoiden Verlaufs der Invasion von Daunoxome darstellen. Die Kinetik könnte dadurch zustande kommen, dass Daunoxome in die Zellen aufgenommen wird, aber nur verzögert freigesetzt wird und deshalb erst ein langsamer Anstieg der Fluoreszenz erfolgt (I. Phase). In einer II. Phase wird Daunorubicin dann aus den Liposomen freigesetzt, wodurch die Fluoreszenz stärker ansteigt und sich nach und nach an die maximale Fluoreszenz des freien Daunorubicins angleicht. Dies könnte ebenfalls die verzögerte Apoptose, verursacht durch Daunoxome, erklären.

Dagegen spricht allerdings, dass bei den Versuchen zur Evasion von Daunoxome nach zwei Stunden Inkubation und Mediumwechsel die gemessene Fluoreszenz konstant bleibt und es nicht zu einem Anstieg dieser kommt. Dies wäre zu erwarten, wenn Daunorubicin intrazellulär verzögert aus den Liposomen freigesetzt wird.

Aus diesen Gründen wird angenommen, dass ein relevanter Quencheffekt, der die Ergebnisse beeinflussen könnte, unwahrscheinlich ist. Damit scheint ein anderer Prozess für das Entstehen der sigmoiden Form der Invasionskurve, welche vorher schon erläutert wurden, von Daunoxome verantwortlich zu sein.

Ein anderes Problem stellt die Wahl der Zeiträume dar, in der die Invasionsversuche durchgeführt werden. Da Daunoxome in den festgelegten Zeiträumen kein Plateau erreicht, wäre es sinnvoll, längere Versuchszeiten zu wählen. Dies ist bei CEM-Zellen, die ideal für Untersuchungen zur Apoptoseinduktion und zur zellulären Pharmakokinetik geeignet sind, nicht möglich, da sie sehr stark zu Apoptoseinduktionen neigen. Durch die zunehmende Anzahl von apoptotischen und nekrotischen Zellen bei längerer Versuchsdauer werden weitere aussagekräftige Messungen unmöglich gemacht. Da aber in dieser Arbeit vornehmlich die initiale zelluläre Pharmakokinetik untersucht wird und

dafür in den gewählten Versuchszeiten sehr gute Ergebnisse erzielt werden, ist auch dies von untergeordneter Bedeutung.

Andere Autoren beobachteten allerdings nach einer längeren Versuchszeit eine Umkehr der Zytotoxizität bei Exposition mit freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin. Nach einer anfänglich besseren zellulären Pharmakokinetik mit höherer Zytotoxizität von Daunorubicin gegenüber Daunoxome kam es nach längeren Versuchszeiten zu einer Angleichung dieser und schließlich zum Nachweis, dass Daunoxome deutlich potenter zu sein scheint als Daunorubicin. Dahingegen konnte in der vorliegenden Arbeit bei der kürzeren Versuchszeit nur eine Angleichung und keine Umkehr der Pharmakokinetik- und -dynamik nachgewiesen werden. Zur Klärung dieser Differenzen sollten weitere Versuche anhand von anderen hämatopoetischen Zelllinien über einen längeren Versuchszeitraum angeschlossen werden.

Zusätzlich soll die Wahl der Methodik kurz erörtert werden. Das Durchflußzytometer, besonders in Kombination mit der Mikroskopie, stellt für Untersuchungen zur Apoptose und zur Pharmakokinetik das Instrument der Wahl dar, was durch verschiedene Autoren wie Nooter et al. [90], Durand et al. [91] und Maciorowski et al. [92] bestätigt wird. Das Durchflußzytometer macht einen hohen Analysedurchfluß in geringer Zeit möglich und liefert eine große Anzahl quantitativer Daten auf zellulärer Ebene. Die Fluoreszenz einzelner Zellpopulationen kann erfasst werden und statistisch ausgewertet werden. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Arbeit die Durchflußzytometrie in Kombination mit konfokaler Lasermikroskopie und Lichtmikroskopie gewählt.

Alternativ dazu könnte die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) genutzt werden. Es ist eine aufwendige Methode, die eines großen Zeitaufwandes bedarf. Hierbei kann kein Unterschied zwischen einzelnen Zellpopulationen, also keine Abgrenzung von apoptotischen Zellen, aufgezeigt werden, da die intrazelluläre Konzentration nach Destruktion der Zellen bestimmt wird. Dies wäre für die Untersuchungen dieser Arbeit von Nachteil. Der Vorteil der HPLC liegt jedoch darin, dass tatsächliche Konzentrationen gemessen werden und nicht nur Fluoreszenzintensitäten. Dadurch können Quencheffekte von anderen Effekten, die die Fluoreszenz beeinflussen können, eliminiert werden. Deshalb ist es eine Methode, mit der die ermittelten Daten verifiziert werden können.

Die zelluläre Pharmakokinetik stellt einen wichtigen Aspekt für die Wirksamkeit aller Substanzen dar. Es sind aber auch andere Aspekte sehr wichtig, um die volle Wirksamkeit von Daunorubicin und Daunoxome ausnutzen zu können. Deshalb sollte zusätzlich zu den in vitro Untersuchungen dieser Arbeit über die zelluläre Pharmakokinetik in vivo-Untersuchungen angeschlossen werden. Besonders interessiert

hierbei die Plasmapharmakokinetik in Verbindung mit der zellulären Pharmakokinetik von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin.

Dabei sollten die Daten zur Kinetik im Zusammenhang mit der Pharmakodynamik und mit klinischen Merkmalen betrachtet werden, um den Vergleich von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin zu vervollständigen.

## **5.6 Klinisch-Pharmakologische Bedeutung der vorliegenden Arbeit und Ausblick**

Als letztes stellt sich nun die Frage, was die ermittelten Daten klinisch pharmakologisch zu bedeuten haben. Wie oben bereits erläutert, verlaufen die Invasion und die intrazelluläre Akkumulation des liposomal verkapselten Daunorubicins im Gegensatz zu freiem Daunorubicin zu Anfang deutlich verlangsamt, wodurch offenbar auch verzögert Apoptose induziert wird. Es ist sehr interessant, dass in dem vorliegenden Tumormodell aufgezeigt wurde, dass dafür unterschiedliche Invasionsmechanismen verantwortlich sein könnten. Während freies Daunorubicin mittels passiver Diffusion in die Zellen einströmt, wird liposomal verkapseltes Daunorubicin durch Endozytose aufgenommen. Es scheint, dass diese in zwei Phasen abläuft. Daunoxome geht in einer ersten Phase zunächst lockere Bindungen mit der Zellmembran ein, bevor es in einer zweiten Phase in die Zellen einströmt. Dies könnte auch den verlangsamten Verlauf der Invasion, das spätere Erreichen der maximalen intrazellulären Konzentrationen und die verzögerte Apoptoseinduktion erklären.

Um diese anfänglich langsameren Effekte auszugleichen, ist für das liposomal verkapselte Daunorubicin eine längere Einwirkdauer der entscheidende Parameter für die zelluläre Kinetik. Da Daunoxome eine längere Halbwertszeit besitzt als Daunorubicin und auch im Serum sehr stabil ist, scheint die längere Expositionszeit in vivo gegeben zu sein. Dadurch dürfte liposomal verkapseltes Daunorubicin trotz anderer Invasionskinetik keine verminderte Wirksamkeit zu freiem Daunorubicin aufweisen.

Wie oben bereits erwähnt, verläuft auch die Evasionskinetik von Daunorubicin und Daunoxome andersartig. Die sehr langsame Evasion von Daunoxome könnte darauf hinweisen, dass länger anhaltende intrazelluläre Konzentrationen erreichbar sind. Auch dies scheint sehr günstig zu sein.

Andere Arbeiten beschreiben anhand verschiedener Tumormodelle allerdings eine deutlich verbesserte Wirkung von liposomal verkapseltem Daunorubicin gegenüber freiem. Deshalb sollte durch gezielte weitere Untersuchungen geklärt werden, ob die Wirksamkeit der beiden Substanzen sich nur angleicht oder ob Daunoxome Daunorubicin tatsächlich überlegen ist. Dafür könnten sich klinische Phase III Studien anbieten, in

denen insbesondere Patienten mit refraktären Leukämien von Interesse sind, die häufig P-Glykoprotein exponieren. Damit könnte auch geklärt werden, ob der zweiphasige Endozytoseprozess als pharmakokinetisch relevanter Aufnahmemechanismus von Daunoxome eine Rolle bei der Resistenzüberwindung spielen könnte.

Solche Studien wären mit dem vorliegenden zellulären Tumormodell vergleichbar, liegen zur Zeit aber noch nicht vor.

Mittlerweile existieren allerdings schon neuere liposomal verkapselte Substanzen (z.B. Caelyx), die noch längere Halbwertszeiten aufweisen als Daunoxome. Diese könnten günstigere pharmakokinetische Daten als Daunoxome aufweisen und sollten deshalb auch in weitere Untersuchungen mit eingeschlossen werden.

Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit kann zusammenfassend gesagt werden, dass liposomal verkapseltes Daunorubicin langsamer in die Zellen einströmt. Nach längerer Exposition können jedoch keine Unterschiede in der maximal erreichten intrazellulären Konzentration und in der Apoptoseinduktion im Vergleich zu freiem Daunorubicin nachgewiesen werden. Ebenfalls strömt das intrazellulär akkumulierte Daunoxome vermindert aus den Zellen aus. Von daher gestaltet sich die Wirksamkeit des liposomal verkapseltem Daunorubicins auf zellulärer Ebene als mindestens genauso gut.

Da die zelluläre Pharmakokinetik einen wichtigen Baustein für die Wirkmechanismen darstellt, kann gefolgert werden, dass die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung der Wirksamkeit von Daunorubicin und Daunoxome geliefert hat.

## 6. Zusammenfassung

Das Anthrazyklin Daunorubicin ist ein häufig angewandtes Zytostatikum in der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen. Das Auftreten von schwerwiegenden Nebenwirkungen wie der Kardiotoxizität und zunehmende Resistenzentwicklung bei der Therapie mit freiem Daunorubicin führte zur Entwicklung des liposomal verkapselten Daunorubicins, genannt Daunoxome. Von einigen Autoren werden weniger Nebenwirkungen, besonders vermindertes Auftreten der Kardiotoxizität, und ein verbessertes Wirksamkeitsprofil für dieses liposomal verkapselte Daunorubicin beschrieben.

Dies wäre für die zytostatische Therapie maligner Erkrankungen von zentraler Bedeutung. Um neuere Erkenntnisse über die Wirksamkeit der beiden Anthrazykline zu erlangen, spielt es eine große Rolle, deren Grundlage, die zelluläre Pharmakokinetik, zu verstehen. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die zelluläre Pharmakokinetik mit Invasion, Evasion, intrazellulärer Verteilung, einschließlich der Apoptoseinduktion von freiem und liposomal verkapseltem Daunorubicin, ermittelt und miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgt in vitro mittels durchflußzytometrischer Messungen zur Invasion, Evasion und der Apoptoseinduktion bei suspendierten CEM-Zellen nach Inkubation mit freiem oder liposomal verkapseltem Daunorubicin über einen Zeitraum von 9 Stunden. Hierbei wird die Konzentration am Wirkort ermittelt, die durch die intrazelluläre Konzentration (Fluoreszenzintensität) determiniert wird. Die untersuchten extrazellulären Konzentrationen liegen bei 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml. Zusätzlich werden die morphologischen Veränderungen während des Apoptoseprozesses lichtmikroskopisch festgehalten.

Der Vergleich der intrazellulären Verteilung der beiden Substanzen erfolgt durch lasermikroskopische Aufnahmen von CEM-Zellen, die der Exposition von Daunorubicin oder Daunoxome in der Endkonzentration 5 µg/ml bis zu 24 Stunden ausgesetzt sind.

Bei den Messungen zur Invasion der beiden Substanzen zeigt sich, dass freies Daunorubicin in allen drei Konzentrationen rasch in die Zellen einströmt und nach 180 min ein Plateau erreicht. Dabei folgt die Invasion einer Sättigungskinetik (negative e-Funktion).

Liposomal verkapseltes Daunorubicin strömt deutlich langsamer in die Zellen ein und erreicht in der gewählten Versuchszeit kein Plateau. Nach 540 min kommt es allerdings zur Angleichung der maximal erreichten Konzentration beider Substanzen. Die Invasionskinetik von Daunoxome beschreibt einen sigmoiden Verlauf, weshalb auf eine zweiphasige Aufnahme der Substanz geschlossen werden könnte. Erst nach einer



lockeren Bindung von Daunoxome an die Zellmembran könnte es zur vollständigen Aufnahme und dadurch zur messbaren intrazellulären Anreicherung kommen.

Für beide Substanzen stellt sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Einstromgeschwindigkeiten und ein linearer Zusammenhang dar. Die hohen extrazellulären Konzentrationen beider Substanzen erreichen im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen die schnellsten Invasionsgeschwindigkeiten und die höchsten intrazellulären Konzentrationen.

Diese Ergebnisse werden durch die lasermikroskopischen Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung unterstützt. Freies Daunorubicin reichert sich rascher intrazellulär an, auch die Fluoreszenz im Kern nimmt deutlich schneller zu. Liposomal verkapseltes Daunorubicin reichert sich verzögert nukleär an, erreicht aber über die Zeit von 24 Stunden ebenso hohe Fluoreszenzwerte wie freies Daunorubicin. Diese unterschiedlichen Daten könnten durch die verschiedenen Aufnahmemechanismen erklärt werden, wobei Daunorubicin mittels passiver Diffusion einströmt und Daunoxome durch einen Endozytoseprozess intrazellulär aufgenommen werden könnte.

Im Vergleich dieser Daten der Invasion und der intrazellulären Verteilung zu den Ergebnissen anderer Autoren besteht Einigkeit darin, dass freies Daunorubicin anfangs rascher in die Zellen einströmt, intrazellulär akkumuliert und damit potenter ist als liposomal verkapseltes Daunorubicin. Einige Autoren weisen allerdings nach einer längeren Versuchsdauer höhere intrazelluläre Konzentrationen von Daunoxome nach und damit eine Umkehr der Zytotoxizität über die Zeit. In dieser Arbeit kommt es lediglich zu einer Angleichung der maximal erreichten Konzentrationen. Diese Differenzen sollten anhand von weiterführenden Versuchen überprüft werden.

Bei den Versuchen zur Evasion zeigt sich, dass freies Daunorubicin biphasisch ausströmt und liposomal verkapseltes Daunorubicin monophasisch. Dies lässt sich vermutlich durch unterschiedliche Verteilungsmodelle der Substanzen erklären. Während für Daunorubicin ein offenes 2-Kompartiment-Modell sprechen könnte, scheint Daunoxome sich in einem offenen 1-Kompartiment-Modell zu verteilen, wodurch die unterschiedlichen Evasionskinetiken zu erklären sind. In anderen vergleichbaren Arbeiten konnten ebenfalls ein biphasischer Ausstrom für freies Daunorubicin und eine monophasische Evasion für liposomal verkapseltes Daunorubicin nachgewiesen werden.

Für die zelluläre Pharmakokinetik ist auch die Apoptoseinduktion durch die Substanzen als Parameter der Pharmakodynamik und damit der Wirksamkeit von großem Interesse. Es zeigt sich, dass die Inkubation mit freiem Daunorubicin deutlich früher zur Apoptoseinduktion führt als die Exposition mit liposomal verkapseltem Daunorubicin. Nach einer längeren Versuchszeit kommt es aber zu einer Angleichung der

Apoptoseraten. Für beide Substanzen ist damit eine Konzentrationsabhängigkeit nachzuweisen. Die hohen extrazellulären Konzentrationen induzieren vermehrt und vor allem rascher Apoptose im Vergleich zu den niedrigeren.

Dies lässt sich erklären, wenn die Apoptoseinduktion im Zusammenhang mit der Invasion und der intrazellulären Verteilung der beiden Substanzen gesehen wird. Freies Daunorubicin invadiert die Zellen schneller und verteilt sich rasch intrazellulär. Dadurch kann auch die Apoptoseinduktion durch Daunorubicin rasch erfolgen.

Liposomal verkapseltes Daunorubicin strömt dahingegen verzögert in die Zellen ein und auch die Fluoreszenzintensität im Kern nimmt langsamer zu. Dadurch induziert DaunoXome anfangs weniger Apoptose. Über die Zeit erfolgt aber eine Angleichung sowohl der maximal erreichten Konzentrationen, als auch der Apoptoseraten beider Substanzen. Lichtmikroskopische Darstellungen der morphologischen Veränderungen während der Apoptose bestätigen, dass Apoptose stattgefunden hat.

Anhand der Daten dieser Arbeit zeigt sich, dass die Konsistenz der Invasionsergebnisse mit den Daten der Apoptoseexperimente dafür sprechen, dass die durchflußzytometrischen Messungen tatsächlich die pharmakologischen Parameter richtig darstellen. Daraus ergibt sich, dass die Kombination von Durchflußzytometrie und Mikroskopie eine geeignete Methode zur Bestimmung der Pharmakokinetik darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass liposomal verkapseltes Daunorubicin im Vergleich zu freiem Daunorubicin initial langsamer einströmt, akkumuliert und verzögert Apoptose induziert. Es erreicht aber nach einer längeren Expositionsdauer ebenso hohe maximale Konzentrationen und Apoptoseraten wie freies Daunorubicin. Um diese verzögerten Effekte auszugleichen, sind eine längere Halbwertszeit und anhaltend hohe extrazelluläre Konzentrationen von DaunoXome notwendig, welche von anderen Autoren bereits beschrieben wurden.

Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass liposomal verkapseltes Daunorubicin auf zellulärer Ebene mindestens genauso wirksam ist wie freies Daunorubicin.

---

**Literaturverzeichnis**

1. REINHARDT G., SEIDEL H.-J., SONNTAG H.-G. ET AL.: Ökologisches Stoffgebiet. 1. Auflage Hippokrates, Stuttgart 1991
2. ROBERT KOCH INSTITUT, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2000
3. FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W. ET AL.: Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, Mannheim 1993
4. WEINSHILBOUM R.M.: The therapeutic revolution. Clin Pharmacol Ther 1987; 42: 481
5. KAROW T., LANG R.: Pharmakologie und Toxikologie. 7. Auflage Druckerei Hansen 1999, Pulheim
6. STORM G., ROERDINK F.H., STEERENBERG P.A. ET AL.: Influence of lipid composition on the antitumour activity exerted by doxorubicin-containing liposomes in a rat solid tumour model. Cancer Res 1987; 47: 3366
7. STORM G., VAN BLOOIS L., STEERENBERG P.A., ET AL.: Liposome encapsulation of doxorubicin: pharmaceutical and therapeutic aspects. J. Contrl. Release 1989; 9: 215
8. ANDREONI A., COLASANTI A., KISSLINGER A. ET AL.: Fluorometric determination of the kinetics of anthracyclines uptake by cells. J Biochem Biophys Meth 1993; 28: 53- 68
9. GROCHOW L.B., AMES M.M.: A clinican's guide to chemotherapy, pharmacokinetics and pharmacodynamic. William and Wilkins, Baltimore, Philadelphia, London 1998.
10. DI MARCO A., GAETANI M., DORIGOTTI L. ET AL.: Studi sperimentali sull'attività antineoplastica del nuovo antibiotico daunomicina. Tumori 1963; 49: 203-217
11. DUBOST M., GANTER P., MARAL R. ET AL.: Un nouvel antibiotique à propriétés cytostatique: la rubidomycine. C.R. Academie des Sciences 1963; 257: 1813-1815
12. ROBERT J.: ANTHRACYCLINES, in Grochow L.B. (Hrsg): A clinican's guide to chemotherapy, pharmacokinetics and pharmacodynamic 1998, S.93-131
13. DORR R.T., VON HOFF D.D.: Cancer Chemotherapy Handbook. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwalk 1994

14. SEEBER S., SCHÜTTE J.: Therapiekonzepte Onkologie. 1. Auflage Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1993
15. DOROSHOW J.H.: Anthracyclines and Anthracenediones, Chapter 17. Cancer Chemotherapy and Biotherapy, 2nd ed., edited by Bruce A., Chabner and Dan L. Longo. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996
16. SWEATMAN T.W., ISRAEL M.: Anthracyclines, Chapter 5. Cancer Therapeutics, Experimental and Clinical Agents, edited by B. A. Teicher 1997
17. ZELLER W.J.: Anthrazykline: Onkologie. Grundlagen, Diagnostik, Therapie und Entwick- lung, Zur Hausen-Onkologie. Ecomed 2000; S. 1-20
18. NAGASAWA K., NATAZUKA T., NOMIYAMA M. ET AL.: Transport Mechanism of Anthracycline Derivates in Human Leukemia Cell line: Uptake and Efflux of Daunorubicin and Doxorubicin in HL60 and its Resistant Cells and Comparison with those of Pirarubicin. Biol. Pharm. Bull. 1996; **19**:100-105
19. FORSSEN E.A., MALÉ-BRUNE R., ADLER-MOORE J.P. ET AL.: Fluorescence Imaging Studies for the Disposition of Daunorubicin Liposomes (DaunoXome) within Tumor Tissue. Cancer Research 1996; **56**: 2059-2065
20. MORJANI H., MILLOT J.-M., BELHOUSSINE R. ET AL.: Anthracycline subcellular distribution in human leukemic cells by microspectrofluorometry: factors contributing to drug-induced cell death and reversal of multidrug resistance. Leukemia 1997; **11**: 1170-1179
21. POWIS G.: Anthracycline metabolism and free radical formation, in: Powis G., Prough R. A. (Hrsg): Metabolism and action of anti-cancer drugs. Taylor & Francis, London 1987; S. 211- 260
22. ALBERTS D.S., BACHUR N.R., HOTZMAN J.L.:The pharmacokinetics of daunomycin in man. Clin Pharmacol Ther 1971; **12**: 96-104
23. HUFFMAN D.H., BACHUR N.R.: Daunorubicin metabolism in acute non-lymphocytic leukemia. Blood 1972 b; **39**: 637-643
24. RAHMANN A., GOODMAN A., FOO W.: Clinical pharmacology of daunorubicin in phase I
25. patients with solid tumors: development of an analytic methodology for daunorubicin and its metabolits. Semin Oncol 1984; **11**: 36-44
26. POSSINGER K., HARTENSTEIN R., EHRHART H.: In-vitro Resistenztestung von Tumoren gegenüber Zytostatika. Onkologie 1980; **6**: 291-300

27. BOVEN E., DE JONG J., KUIPER C.M. ET AL.: Relationship Between the Tumour Tissue Pharmacokinetics and the Antiproliferativ Effects of Anthracyclines and their Metabolites. *European Journal of Cancer* (Vol. 32A) 1996; **8**: 1382-1387
28. POSSINGER K., WAGNER H., WORST P. ET AL.: Oral Administration of Idarubicin as First Line Cytostatic Therapy in Patients with Metastasized Breast Cancer and Favourable Prognosis. *Onkologie* 1991; **14**: 31-34
29. CUSACK B.J., YOUNG S.P., VESTAL R. ET AL.: Age-related pharmacokinetics of daunorubicin and daunorubicinol following intravenous bolus daunorubicin administration in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; **39**: 505-512
30. NIELSEN D., MAARE C., SKOVSGAARD T.: Cellular Resistance to Anthracyclines. *Gen. Pharmac.* (Vol. 27) 1996; **2**: 251-255  
Cassidy J.: Pharmacokinetics, Targeting and Delivery Systems in Anthracycline-resistant Cancers. *European Journal of Cancer* (Vol. 31 A) 1995; **7**: 18-20
31. BOGUSH T., SMIRNOVA G., SHUBINA I. ET AL.: Direct evaluation of intracellular accumulation of free and polymer-bound anthracyclines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; **35**: 501-505
32. BANGHAM A.D., STANDISH M.M., WATKINS J.C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 1965; **13**: 238-252
33. SESSA G., WEISSMANN G.: Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid. Res.* 1968; **9**: 310-318
34. RANSON M., HOWELL A., CHEESEMAN S.: Liposomal drug delivery. *Cancer Treatment Reviews* 1996; **22**: 365-379
35. STORM G., CROMMELIN D.J.A.: Colloidal Systems for Tumor Targeting. *Hybridoma* (Vol. 16) 1997; **1**: 119-125
36. ALLEN T.M., HANSEN C.B., LOPES D.E. ET AL.: Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995; **16**: 267-284
37. OKU N., NAMBA Y.: Long-Circulating Liposomes. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1994; **11** (4): 231-270
38. FORSSEN E.A., ROSS M. E.: Daunoxome Treatment of Solid Tumors: Preclinical and Clinical Investigations. *Journal of Liposome Research* 1994; **4**: 481-512
39. SHARMA A., SHARMA U.S.: Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 1997; **154**: 123-140
40. MASSING U.: Cancer therapy with liposomal formulations of anticancer drugs. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1997; **35**: 87-90

41. NeXstar Pharmaceuticals: DaunoXome, liposomal daunorubicin. Braunschweig 1996
42. SARGENT J.M., ELGIE A.W., WILLIAMSON C.J. ET AL.: In Vitro Sensitivity to the Liposomal Preparation, DaunoXome in CLL. *Anticancer Research* 1999; **19**: 3253-3258
43. RICHARDSON D.S., KELSEY S.M., JOHNSON S.A.: Early evaluation of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in the treatment of relapsed and refractory lymphoma. *Investigational New Drugs* 1997; **15**: 247-253
44. FORSSEN E.A., COULTER D.M, PROFFITT R.T.: Selective In Vivo Localization of Daunorubicin Small Unilamellar Vesicals in Solid Tumors. *Cancer Research* 1992; **52**: 3255-3261
45. GILL P.S., ESPINA B.M., MUGGIA F. ET AL.: Phase I/II Clinical and Pharmacokinetic Evaluation of Liposomal Daunorubicin. *Journal of Clinical Oncology* (Vol.13) 1995; **4**: 996-1003
46. YEO W., CHAN K.K., MUKWAYA G. ET AL.: Phase II studies with DaunoXome in patients with nonresectable hepatocellular carcinoma: clinical and pharmacokinetic outcomes. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; **44**: 124-130
47. FUMAGALLI L., ZUCCHETTI M., PARISI I. ET AL.: The pharmacokinetics of liposomal encapsulated daunorubicin are not modified by HAART in patients with HIV-associated Kaposi's sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; **45**: 495-501
48. ERMACORA A., MICHIELI M., PEA F. ET AL.: Liposome encapsulated daunorubicin (daunoxome) for acute leukemia. *Haematologica* 2000; Vol.85 (**3**)
49. PRATT G., WILES M.E., RAWSTRON A.C. ET AL.: Liposomal Daunorubicin: In Vitro and In Vivo Efficacy In Multiple Myeloma. *Hematological Oncology* 1998; **16**: 47-55
50. Research Reports: Daunoxome Data Presented at International Cancer Meeting. *Oncology* (Vol. 10) 1996; **6**:830
51. RAHMAN A., HUSAI S.R., SIDDIQUI J. ET AL.: Liposome –Mediated Modulation of Multidrug Resistance in Human HL-60 Leukemia Cells. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**: 1909-1915
52. VAN ENGELAND M., NIELAND L.J.W., RAMAEKERS F.C.S.: Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* 1998; **31**: 1-9
53. THOMAS C.: Histopathologie. 12.Auflage, Schattauer, Stuttgart 1998.
54. BOGENSBERGER S., BOSS N., BÜTTNER M. ET AL.: Roche Lexikon Medizin 4.Auflage. Urban & Schwarzenberg, München 1999

55. VIAL J-P., BELLOC F., DUMAIN P. ET AL.: Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukemic cells. *Leukemia Research* (Vol. 21) 1997; **2**: 163-172
56. GIESELER F., BIRSACK H., BRIEDEN T. ET AL.: Cytotoxicity of anthracyclins: correlation with cellular uptake, intracellular distribution and DNA binding. *Ann Hematol* 1994; **69**: 13-17
57. GIESELER F., NÜßLER V., BRIEDEN T., ET AL.: Intracellular pharmacokinetics of anthracyclines in human leukemia cells: correlation of DNA-binding with apoptotic cell death. *Int J Clin Pharmacol Ther* (Vol. 1) 1997; **36**: 25-28
58. NEGRI C., BERNARDI R., DONZELLI M. ET AL.: Induction of apoptotic cell death by DNA topoisomerase II inhibitor. *Biochim* 1995; **77**: 893-899
59. SOLARY E., BERTRAND R., POMMIER Y.: Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL 60 cells. *Leuk Lymphoma* 1994; **15**: 21-32
60. DARZYNKIEWICZ Z., JUAN G., LI X. ET AL.: Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). *Cytometry* 1997; **27**: 1-20
61. GARLAND J.M., HALESTRAP A.: Energy Metabolism during Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272) 1997; **8**: 4680-4688
62. SHIDOJI Y., NAKAMURA N., MORIWAKI H. ET AL.: Rapid Loss in Mitochondrial Membrane Potential during Geranylgeranoic Acid-Induced Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; **230**: 58-63
63. HESS K.L., BABCOCK G.F., ASKEW D.S. ET AL.: A Novel Cytometric Method for Quantifying Phagocytosis of Apoptotic Cells. *Cytometry* 1997; **27**: 145-152
64. HARA S., DOROTA H., BRUNO S. ET AL.: Effect of Protease Inhibitors on Early Events of Apoptosis. *Experimental Cell research* 1996; **223**: 372-384
65. GORMAN A.M., SAMALI A., MCGOWAN A.J. ET AL.: Use of Flow Cytometry Techniques in Studying Mechanisms of Apoptosis in Leukemic Cells. *Cytometry* 1997; **29**: 97-105
66. WADIA J.S., CHALMERS-REDMAN R.M.E., JU W.J.H. ET AL.: Mitochondrial Membrane Potential and Nuclear Changes in Apoptosis Caused by Serum and Nerve Growth Factor Withdrawal: Time Course and Modification by (-) -Deprenyl. *The Journal of Neuroscience* (Vol. 3) 1998; **18**: 932-947
67. WARING P., BEAVER J.: Cyclosporin A Rescue Thymocytes from Apoptosis Induced by Very Low Concentrations of Thapsigargin: Effects on Mitochondrial Function. *Experimental Cell Research* 1996; **227**: 264-276

- 
68. ISAACS J.T.: Role of programmed cell death in carcinogenesis. *Envir Health Perspectives* (Suppl 5) 1993; **101**: 27-34
69. FERLINI C., DI CESARE S., RAINALDI G. ET AL.: Flow Cytometric Analysis of the Early Phases of Apoptosis by Cellular and Nuclear Techniques. *Cytometry* 1996; **24**: 106-115
70. FOLEY G.E., LAZARUS, FARBER S. ET AL.: Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 1965; **18**: 522-529
71. TARASIUK J., FOUCRIER J., GARNIER-SUILLEROT A.: Cell cycle dependent uptake and release anthracycline by drug-resistant and drug-sensitive human leukaemic K62 cells. *Biochem.Pharmacol.* 1993; **45** (9): 1801-1808
72. MC GOWN A.T., WARD T.H., FOX B.W.: Comparative Studies on the Uptake of Daunorubicin in Sensitive and Resistant P388 Cell Lines by Flow Cytometry and Biochemical Extraction Procedures. *Cancer Chemother Pharmacol* 1983; **11**: 113-116
73. FLATH B., POSSINGER K.: Wert der Durchflußzytometrie bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Leukämien und Lymphomen. *Krebs* 1997; **16** (1): 16-21
74. RAFFAEL A., NEBE C.TH., VALET G.: Grundlagen der Durchflußzytometrie in Schmitz-Rothe (Hrsg): *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schattauer, Stuttgart 1994, S. 3-48
75. JAROSZESKI M.J., RADCLIFF G.: Fundamentals of Flow Cytometry. *Molecular Biotechnology* 1999; **11**: 37-53
76. LONGOBARDI GIVAN A.: *Flow Cytometry: First Principals*. Wiley-Liss, Inc., New York 1992
77. INOUÉ S.: Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy in Pawley J.B.(Hrsg): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York 1990, S. 1-14
78. SHEPPARD C.J.R.: Confocal Microscopy: Basic Principals and System Performance in Cheng P.C., Lin T.H., Wu W.L. et al. (Hrsg): *Multidimensional Microscopy*. Springer, New York 1994, S. 1-31
79. GRATTON E., VAN DE VEN M.J.: Laser Source for Confocal Microscopy in Pawley J.B.(Hrsg): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York 1990, S. 53-67



80. KITAGAWA H.: Theory and Principal Technologies of the Laser Scanning Confocal Microscopy in Cheng P.C., Lin T.H., Wu W.L., et al.(Hrsg): Multidimensional Microscopy Springer, New York 1994, 53-71
81. STELZER E.H.K.: The Intermediate Optical System of Laser Scanning Confocal Microscopes in Pawley J.B.(Hrsg): Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York 1990,S. 93-103
82. WELLS K.S.: Quantitative Fluorescence Imaging with Laser Scanning Confocal Microscopy in Pawley J.B.(Hrsg): Handbook of Biological Confocal Microscopy. Plenum Press, New York 1990,S. 27-39
83. NAGASAWA K., TAKARA K., NOMIYAMA M. ET AL.: Transport Mechanisms of Anthracycline Derivates in Human Leukemia Cell lines: Uptake of Pirarubicin, Daunorubicin and Doxorubicin by K562 and Multidrug-Resistant K562/ADM Cells. Biol. Pharm. Bull. (Vol. 7) 1996; **19**: 971-976
84. SERAFINO A., SINIBALDI-VALLEBONA P., PIERIMARCHI P. ET AL.: Induction of Apoptosis in Neoplastic Cells by Anthracycline Antitumor Drugs: Nuclear and Cytoplasmatic Triggering?. Anticancer Research 1999; **19**: 1909-1918
85. SERAFINO A., SINIBALDI-VALLEBONA P., GAUDIANO G. ET AL.: Cytoplasmatic localisation of anthracycline antitumor drugs conjugated with reduced glutathione: a possible correlation with multidrug resistant mechanisms.Anticancer Res 1998; **18**: 1159-1166
86. FORSSEN E., CHAN K.K., MUGGIA F.M. ET AL.: Clinical pharmacokinetics of liposomal daunorubicin. Proc Am Assoc Cancer Res 1990; **31**: 181
87. Research Reports: Daunoxome an "Active Agent" in Patients with Relapsed or Refractory NHL, Say Independent Investigators. Oncology (Vol. 10) 1996; **12**: 1856
88. LAUTIER D., BAILLY J.-D., DEMUR C. ET AL.: Altered Intracellular Distribution of Daunorubicin in Immature Acute Myeloid Leukemia Cells. Int. J. Cancer 1997; **71**: 292-299
89. CHIODINI B., BASSAN R., BARBUI T.: Cellular Uptake and Antiproliferative Effects of Therapeutic Concentrations of Idarubicin or Daunorubicin and their Alcohol Metabolites, with or without Cyclosporin A, in MDR1+ Human Leukemic cells. Leukemia and Lymphoma 1999; 33 (**5-6**): 485-497
90. NOOTER K., OOSTRUM R., JONKER R. ET AL.: Effect of cyclosporin A on daunorubicin accumulation in multidrug-resistant P388 leukemic cells measured by real-time flow cytometry. Cancer Chemother Pharmacol 1989; **23**: 296-300

- 
91. DURAND R.E., OLIVE P.L.: Flow Cytometry Studies of Intracellular Adriamycin in Single Cells in vitro. Cancer Research 1981; **41**: 3489-3494
  92. MACIOROWSKI Z., DELIC J., PADOY E. ET AL.: Comparative Analysis of Apoptosis Measured by Hoechst and Flow Cytometry in NHL. Cytometry 1998; **32**: 44-50

## Verzeichnis der Graphiken und Abbildungen

Abb. 1: Strukturformel von Daunorubicin .....	2
Abb. 2: Darstellung der Metabolisierung von Daunorubicin zu dessen Hauptmetabolit Daunorubicinol und anderen Metaboliten .....	3
Abb. 3: Darstellung der Lipiddoppelschicht und des wässrigen Kerns eines Liposom und des Einbaus von hydrophilen und lipophilen Substanzen [aus Sharma, [38]] .....	6
Abb. 4: Struktur des Daunoxome [aus NeXstar [41]] .....	7
Abb. 5: Schematische Darstellung der äußeren und inneren Membran von vitalen und apoptotischen Zellen und dem Verlust der Asymmetrie der Lipiddoppelschicht während der Apoptose und der Exposition von Phosphatidylserinen (PS, rote Kreise) auf der äußeren Membran [aus van Engeland, [52]].....	11
Abb. 6: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose mit Zelldehydratation (Abnahme der Zellgröße), Chromatinkon- densation, Kernfragmentation und Bildung von apoptotischen Körpern mit Erhalt der Plasmamembranintegrität [aus Darzynkiewicz, [60]] .....	12
Abb. 7: Darstellung des optischen Systems eines Durchflußzytometers [ aus Raffael, [74]] .....	21
Abb. 8: Qualitative Darstellung von Fluoreszenzsignalen.....	22
Abb. 9: Darstellung zur Abgrenzung der vitalen Zellen im Vor-wärts/Seitwärts-Scatter und Darstellung der Häufig-keitsverteilung der Fluoreszenz im FL2-Histogramm .....	23
Abb. 10: Log Fluoreszenz Dot Plot von Annexin V und PI gefärbten CEM- Zellen, Trennung von vitalen (R1), apoptotischen (R2), und nekrotischen (R3) Zellen bei unbehandelten CEM-Zellen.....	24
Abb. 11: Schematische Darstellung des optischen Systems eines Lasermikroskops .....	26
Abb. 12: Zunahme der Fluoreszenzintensitäten der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit .....	29
Abb. 13: Beispiel zur Bestimmung von $V_{30}$ und $V_{max}$ anhand der Kurven der Invasionskinetik von Daunorubicin und Daunoxome in drei unterschiedlichen Konzentrationen anhand der Formeln aus 3.2. ....	31
Abb. 14: Darstellung der apoptotischen (schwarz markiert) und vitalen (rot markiert) Zellen im Vorwärts/Seitwärts-Scatter bei Inkubation mit 10 µg/ml Daunorubicin im Verlauf von 0 min, 180 min und 540 min .....	33
Abb. 15: Kurvenverlauf der Fluoreszenzintensitäten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml in Abhängigkeit von der Zeit .....	35
Abb. 16: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 120 min Inkubation .....	37
Abb. 17: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 240 min Inkubation .....	37
Abb. 18: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 360 min Inkubation .....	38
Abb. 19: Vergleich der Apoptoseraten von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µg/ml nach 480 min Inkubation .....	38

<b>Abb. 20: Darstellung des Verlaufs aller Apoptosewerte von Daunorubicin und Daunoxome 10 µg/ml, 5 µg/ml und 1 µg/ml in einem Liniendiagramm .....</b>	<b>40</b>
<b>Abb. 21: Darstellung einer Übersicht von vitalen CEM-Zellen, es zeigen sich keine Anzeichen von typisch morphologischen Veränderungen während der Apoptose .....</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 22: Darstellung einer vitalen und zweier apoptotischer Zellen mit charakteristischen Veränderungen der Morphologie wie Zellschrumpfung, Formveränderung Kondensation des Kernchromatins, hyperchromatischer DNA und veränderter Anfärbung der Zellen .....</b>	<b>42</b>
<b>Abb. 23: Darstellung von drei vitalen Zellen und einer apoptotischen Zelle mit morphologischen Veränderungen, wie Kernfragmentation und Kernauflösung .....</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 24: Darstellung von vier apoptotischen Zellen mit charakteristischen Veränderungen, wie stark angefärbten Kernfragmenten im Zytoplasma verteilt und Ablösung eines apoptotischen Körpers an der linken Zelle .....</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 25: Darstellung von zwei apoptotischen Zellen mit charakteristischen Veränderungen, wie der Ablösung von „apoptotischen Körpern“ bei der unteren Zelle .....</b>	<b>45</b>
<b>Abb. 26: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin 5 µg/ml nach 1,5 h Inkubation, die Fluoreszenz befindet sich im Zytoplasma, der Kern ist frei .....</b>	<b>46</b>
<b>Abb. 27: Darstellung der intrazellulären Verteilung von liposomal verkapseltem Daunorubicin (Daunoxome) 5 µg/ml nach 1,5 h Inkubation anhand multipler Zellen, bei denen sich die Fluoreszenz im Zytoplasma befindet, die Kerne sind frei .....</b>	<b>47</b>
<b>Abb. 28: Darstellung der intrazellulären Verteilung von freiem Daunorubicin 5 µg/ml nach 3 h Inkubation, die Fluoreszenz verteilt sich unregelmäßig im Kern mit stärkeren und schwächeren Arealen, das Zytoplasma ist fast frei .....</b>	<b>48</b>
<b>Abb. 29: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunoxome 5 µg/ml nach 3 h Inkubation, das Zytoplasma ist fast frei, im Kern verteilt sich die Fluoreszenz unregelmäßig .....</b>	<b>49</b>
<b>Abb. 30: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin nach 6 h Inkubation, das Zytoplasma weist keine Fluoreszenz auf, im Kern verteilt sie sich unregelmäßig ...</b>	<b>50</b>
<b>Abb. 31: Darstellung der intrazellulären Verteilung von Daunorubicin nach 24 h Inkubation mit sehr starker Fluoreszenz im Kern und keiner im Zytoplasma .....</b>	<b>51</b>
<b>Abb. 32: Schematische Darstellung zweier Kompartimente mit der Verteilung von gebundenen und freien Substanzkonzentrationen [aus Forth, [3]], dieses Modell stellt die Verteilung von freiem Daunorubicin dar .....</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 33: Kurvenverlauf der maximalen Einstromgeschwindigkeit von Daunorubicin und Daunoxome in drei Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml) .....</b>	<b>57</b>

---

**Verzeichnis der Tabellen**

<b>Tab. 1: Darstellung der Ergebnisse eines Invasionsversuchs mittels Durchflußzytometrie, Abhängigkeit der Fluoreszenzen (Einheit“Mean Channel Number“) von Daunorubicin und Daunoxome in drei Konzentrationen von der Inkubationszeit (in min) .....</b>	<b>29</b>
<b>Tab. 2: Vergleich der Ergebnisse der <math>V_{30}</math>–Bestimmung von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml anhand der Invasionsversuche .....</b>	<b>32</b>
<b>Tab. 3: Vergleich der Ergebnisse der <math>V_{max}</math>-Bestimmung von Daunorubicin und Daunoxome in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml anhand der Invasionsversuche.</b>	<b>32</b>
<b>Tab. 4: Darstellung der Ergebnisse eines Evasionsversuchs mittels Durchflußzytometrie, Abhängigkeit der Fluoreszenzen (Einheit „Mean Channel Number“) von Daunorubicin und Daunoxome in drei Konzentrationen von der Inkubationszeit (in Minuten).....</b>	<b>34</b>

---

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Dr. B. Flath für die hervorragende Betreuung und großartige Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. K. Possinger für die Überlassung des Themas.

Des weiteren danke ich Frau Becker für ihre freundliche Hilfestellung bei dem experimentellen Teil der Arbeit, Herrn Dr. A. Ladhoff für die Hilfe bei den lasermikroskopischen Untersuchungen und Alexander Hoffmann und Herrn Dr. A. Dietze für die Mitarbeit bei der Datenverarbeitung.

Ebenfalls möchte ich mich sehr bei Jelena und Karola für die technische und moralische Unterstützung bedanken.

Besonders danke ich auch meiner gesamten Familie und meinem Mann Stefan, die mir diese Arbeit erst ermöglicht haben und mich dabei begleitet haben.

---

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eidesstatt, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 16.12.01

Anna-Maria Bartels

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Anna-Maria Bartels, geb. Hoffmann  
Geburtstag: 12.02.1974  
Geburtsort: Berlin  
Anschrift: Sigmaringerstr. 20  
10713 Berlin

### Schul Ausbildung

1980 bis 1986 Ernst-Habermann-Grundschule  
1986 bis 1993 Paul-Natorp Gymnasium

### Studium

1993 bis 2000 Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin  
1995 bis 1996 Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität in Oslo

### Examina

August 1995 Ärztliche Vorprüfung  
März 1997 I. Staatsexamen  
März 1999 II. Staatsexamen  
Mai 2000 III. Staatsexamen

### Ärztliche Tätigkeit

Seit Juli 2001 AIP an der Medizinischen Klinik des Zentralkrankenhauses Vestfold in Norwegen